

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI

RELATION ENTRE PHÉNOTYPE ET GÉNOTYPE MITOCHONDRIAL: MESURE
DU MÉTABOLISME MITOCHONDRIAL EN FONCTION DE LA TEMPÉRATURE
CHEZ DEUX HAPLOTYPES DE *DROSOPHILA SIMULANS*

THÈSE
PRÉSENTÉE
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DU DOCTORAT EN BIOLOGIE
UQAM-INRS-IAF EXTENSIONNÉ À L'UQAR

PAR
NICOLAS PICHAUD

MAI 2011

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

À ma famille, mes amis et M-H

"I have not failed. I've just found 10 000 ways that won't work."

Thomas Alva Edison (1847-1931)

REMERCIEMENTS

Tellement de monde à remercier !!!!!

Tout d'abord, je tiens à remercier de tout cœur mon directeur de recherche Pierre Blier pour m'avoir toujours écouté et supporté de même que pour m'avoir fait confiance tout au long de ces cinq années. On dit que notre directeur de recherche déteint sur nous, j'espère dans tout les cas que ce sera le cas pour moi dans mon avenir... MERCI!!!!

I would like to thank my co-supervisor Bill Ballard for having accepted to be part of that adventure. I would like to do some flies' collect with you, maybe in the future...Thank you very much.

Merci aussi aux autres collaborateurs de cette thèse, Robert Tanguay et Geneviève Morrow pour m'avoir enseigné l'art des mouches.

Merci aux membres du comité de thèse qui ont pris le temps de lire et corrigé ce projet.

Merci à la gang du lab : Hélène Lemieux, Sophie Breton, Étienne Hébert Châtelain, Simon Lamarre, Caroline Jose, Roland Vergilino et Charles Jutras. On a eu pas mal de « fun » à travailler ensemble et à écouter de la musique de lesbienne... Merci à Thomas Grünbaum pour les belles discussions sur nos avenir respectifs et sur les mangas... Merci à vous tous, heureusement que vous étiez là pour partager mon bonheur et mes frustrations !!!!

Merci à toute ma famille, qui m'a toujours encouragé et n'a jamais critiqué les choix que j'ai fait. Je vous aime tous et je pense très fort à vous.

Un gros, gros, gros, gros, énorme merci à tous mes amis d'ici (Bertrand,

Catherine, Antoine, Julie, Claudie, Guillaume, Mayi, André, Cyril, Hervé, Lolo, Welley, Martin, Ana, Manu, Claire, Seb, Sylvain, l'équipe de soccer, la gang du baro, et j'en oublie...) et d'ailleurs (Mich, Léti, Ju, Sandra, Carole, Ben, Tom, Lulu, Mimi, Franck, Obispo, les Mourets, Fontvieille, St Jérôme, là aussi j'en oublie...), c'est grâce à vous que je n'ai jamais abandonné et que j'ai réussi à aller jusqu'au bout !!!!!

Merci à Masashi Kishimoto et à Eiichiro Oda pour m'avoir fait rêver et m'avoir permis de trouver mon nindo.

Merci à mes mouches, je les ai massacrées pendant 4 ans, un génocide de masse pour elles...

Et surtout MERCI, MERCI, MERCI à Marie-Hélène qui m'a supporté (ce qui n'était pas chose facile...). Désolé pour ce que tu as du enduré. Je t'aime fort.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES	xii
LISTE DES TABLEAUX.....	xiv
RÉSUMÉ.....	xv
CHAPITRE I	
INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
Mitochondries et métabolisme aérobie.....	1
Système de transport des électrons et convergence à la jonction Q	2
Les espèces réactives de l'oxygène.....	5
Mesure de la respiration mitochondriale.....	9
Signification des paramètres mesurés	11
L'excès apparent de cytochrome c oxydase.....	17
Analyse de contrôle métabolique et coefficient de contrôle	18
Isolations mitochondriales et fibres perméabilisées.....	19
Effets généraux de la température sur la respiration aérobie	20
Génome mitochondrial et variations de température	21
Contrôle et régulation de la respiration mitochondriale en fonction de la température	22

<i>Drosophila simulans</i> , un modèle biologique unique.....	23
Objectifs du projet	26

CHAPITRE II

THERMAL SENSITIVITY OF MITOCHONDRIAL METABOLISM IN TWO DISTINCTS MITOTYPES OF DROSOPHILA SIMULANS: EVALUATION OF MITOCHONDRIAL PLASTICITY	29
2.0 Résumé	30
2.1 Abstract.....	31
2.2 Introduction	32
2.3 Materials and Methods	35
2.3.1 Fly lines	35
2.3.2 Fly sampling	36
2.3.3 Isolation of intact mitochondria.....	37
2.3.4 Mitochondrial respiration.....	38
2.3.5 Enzymatic analyses and oxidative stress markers	39
2.3.6. Temperature coefficient values (Q_{10})	44
2.3.7. Chemicals.....	45
2.3.8. Construction of biochemical threshold plots	45
2.3.9. Statistical analyses	45

2.4 Results	46
2.4.1 Mitochondrial respiration	46
2.4.2 Enzymatic measurements	49
2.4.3 COX excess capacity and flux metabolic control	51
2.5 Discussion	54
2.6 Acknowledgements	60

CHAPITRE III

THERMAL SENSITIVITY OF MITOCHONDRIAL FUNCTIONS IN PERMEABILIZED MUSCLE FIBERS FROM TWO POPULATIONS OF DROSOPHILA SIMULANS WITH DIVERGENT MITOTYPES	61
3.0 Résumé	62
3.1 Abstract	63
3.2 Introduction	64
3.3 Material and methods	68
3.3.1 Fly mitotypes	68
3.3.2 Preparation of permeabilized muscle fibers	69
3.3.3 High-resolution respirometry	70
3.3.4 Enzymatic analyses	72
3.3.5 Protein content	73
3.3.6 Temperature coefficient values	73

3.3.7 Chemicals.....	73
3.3.8 Statistical analyses	74
3.4 Results.....	74
3.4.1 Fly sampling	75
3.4.2 Respiratory Control Ratios.....	76
3.4.3 Cytochrome <i>c</i> effect and Uncoupling Control Ratio.....	77
3.4.4 Respiration rates.....	77
3.4.5 Substrate Control Ratio (SCR).....	79
3.4.6 Cytochrome <i>c</i> oxidase excess capacity and flux control coefficient.....	81
3.4.7 Enzymatic analyses	83
3.4.8 Effects of temperature	84
3.5 Discussion.....	86
3.6 Perspective and significance	92
3.7 Acknowledgments	93

CHAPITRE IV

DISRUPTION OF MITOCHONDRIAL FUNCTION IN INTROGRESSED DROSOPHILA SIMULANS AND THE ADAPTIVE VALUE OF MITOCHONDRIAL DNA.....	94
4.0 Résumé	95

4.1 Abstract.....	96
4.2 Introduction	97
4.3 Materials and Methods.....	101
4.3.1 Fly lines	101
4.3.2 Preparation of permeabilized muscle fibers	103
4.3.3 High-resolution respirometry	104
4.3.4 Enzymatic analyses	106
4.3.5 Protein content	107
4.3.6 Temperature coefficient values	107
4.3.7 Chemicals.....	108
4.3.8 Statistical analyses	108
4.4 Results	108
4.4.1 Fly weight	109
4.4.2 Respiratory Control Ratios.....	109
4.4.3 Cytochrome <i>c</i> effect and Uncoupling Control Ratio.....	110
4.4.4 Respiration rates.....	111
4.4.5 Substrate Control Ratio (SCR).....	113
4.4.6 Cytochrome <i>c</i> oxidase excess capacity and flux control coefficient.....	113
4.4.7 Effects of temperature	115

4.4.8 Enzymatic analyses	116
4.5 Discussion.....	118
4.6 Acknowledgments	124
 CHAPITRE V	
DISCUSSION	125
5.1 Thermosensibilité du métabolisme mitochondrial <i>in vitro</i>	128
5.2 Thermosensibilité des fonctions mitochondriales <i>in situ</i>	131
5.3 Potentiel adaptatif associé aux divergences de l'ADN mitochondrial.....	135
5.4 Perspectives	138
5.4.1 Interactions entre génome nucléaire et génome mitochondrial	138
5.4.2 Application de l'approche <i>in situ</i>	142
5.4.3 Contrôle de flux métabolique et température	143
RÉFÉRENCES	146

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Coupe d'une mitochondrie.	2
1.2 Convergence des électrons au niveau de la jonction Q.	5
1.3 Transport des électrons et production de superoxyde dans les mitochondries de <i>Drosophila</i> (Adaptée de Miwa et Brand, 2003).	8
1.4 Différents stades de respiration obtenus par l'ajout de différents substrats dans des mitochondries isolées.	13
1.5 Fréquences des haplogroupes d'ADNmt de <i>D.simulans</i>	25
2.1 Sodium azide inhibition of cytochrome c oxidase activity at 24 °C.	43
2.2 Mitochondrial functions measured at four different temperatures in isolated mitochondria from the two mitotypes of <i>Drosophila simulans</i> <i>sII</i> and <i>sIII</i>	47
2.3 Effect of temperature on Respiratory Control Ratio (RCR).	49
2.4 Thermal sensitivity of different key enzymes of mitochondrial metabolism and the antioxidant system from the two mitotypes, <i>sII</i> and <i>sIII</i>	50
2.5 Complex IV thresholds measured at four different temperatures in the two mitotypes studied, <i>sII</i> and <i>sIII</i>	52
3.1 Effect of temperature on Respiratory Control Ratio (RCR = CI/state2).	76
3.2 Mitochondrial functions measured at four different temperatures in permeabilized fibers from the two mitotypes of <i>Drosophila simulans</i> <i>sII</i> and <i>sIII</i>	78

3.3 Substrate Control Ratio (SCR) calculated at four different temperatures in permeabilized fibers from the two mitotypes, <i>sII</i> and <i>sIII</i> .	80
3.4 Apparent COX excess capacity measured at 12°C in two mitotypes studied, <i>sII</i> and <i>sIII</i> .	82
3.5 Mean (\pm SD) of PDH activities of <i>Drosophila simulans</i> mitotypes <i>sII</i> and <i>sIII</i> measured in 10 different homogenates per mitotype per temperature.	83
3.6 Temperature coefficients (Q_{10}) for mitochondrial respiratory fluxes.	85
4.1 Design of introgressions for <i>sII</i> -introgressed flies. The four constructed lines were pooled for experimental measurements.	102
4.2 Effect of temperature on Respiratory Control Ratio ($RCR = CI/state2$).	110
4.3 Mitochondrial functions measured at four different temperatures in permeabilized fibers from the two haplotypes of <i>Drosophila simulans</i> <i>sII</i> -introgressed and <i>sIII</i> -controls.	112
4.4 Apparent COX excess capacity measured at 12°C in two haplotypes studied, <i>sII</i> -introgressed and <i>sIII</i> -controls.	114
4.5 Temperature coefficients (Q_{10}) for mitochondrial respiratory fluxes and for pyruvate dehydrogenase (PDH) activity.	116
4.6 Mean (\pm SD) of PDH activities of <i>Drosophila simulans</i> haplotypes <i>sII</i> -introgressed and <i>sIII</i> -controls measured in 10 different homogenates per haplotype per temperature.	117
5.1 Flux d'oxygène (exprimés en pmol d'O ₂ consommés par seconde par mg de protéine) mesurés <i>in situ</i> à 24°C dans les haplotypes <i>sII</i> et <i>sIII</i> ainsi que dans les haplotypes altérés (<i>sII</i> -introgressé) et maintenus (<i>sIII</i> -contrôle).	136

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
1.1 Définitions des stades de respiration dans les mitochondries	12
1.2 Définitions des stades respiratoires. Convention proposée à partir de l'ordre typique d'addition des agents durant une expérimentation.....	12
1.3 Nombre et pourcentage de nucléotides et d'acides aminés variants dans l'ADN mitochondrial de <i>Drosophila simulans</i> et <i>Drosophila melanogaster</i>	234
2.1 Values of inhibition constant (K_i) of sodium azide and values of metabolic flux control (C_i)	Erreur ! Signet non défini.
2.2 Values of Uncoupled control ratios (UCRs) measured in mitochondrial isolations	Erreur ! Signet non défini.
2.3 Temperature coefficients (Q_{10}) for $ACO.CS^{-1}$ ratios and for mitochondrial respiratory fluxes in state 3m	53
3.1 Analyses of variance results showing F ratios with two different variables (mitotype and temperature)	75
3.2 Comparisons of mitochondrial functions measured at four different temperatures in isolated mitochondria, in permeabilized fibers, and in permeabilized fibers corrected for Rox from the two mitotypes <i>siII</i> and <i>siIII</i>	79
5.1 Divergences des acides aminés de l'ADNmt au niveau de chaque complexe de l'ETS dans <i>Drosophila simulans</i> (<i>siI</i> , -II, -III) et <i>Drosophila melanogaster</i> (<i>D. mel</i>).	14141

RÉSUMÉ

Les mitochondries possèdent leur propre matériel génétique (ADN mitochondrial ou ADNmt) qui code pour des peptides interagissant avec ceux codés par l'ADN nucléaire pour former les complexes du système de transport des électrons (ETS) ainsi que l'ATP synthase qui participent au processus de phosphorylation oxydative (OXPHOS). Il a été suggéré que la sélection sur l'ADNmt peut mener à des haplotypes adaptés à différents environnements. Dans cette thèse, *Drosophila simulans* a été choisie pour examiner le potentiel adaptatif des divergences de l'ADN mitochondrial. Cette espèce présente trois haplogroupes (*sil*, *sill* et *silll*) subdivisés avec approximativement 3% de divergences inter-haplogroupes mais n'ayant aucune subdivision nucléaire observée au niveau des loci codés par l'ADN nucléaire. Le principal objectif de ce travail était d'examiner le rôle de l'ADN mitochondrial sur l'établissement de caractères phénotypiques tel que le métabolisme mitochondrial des haplotypes *sill* et *silll* de *Drosophila simulans* et de déterminer le potentiel adaptatif des divergences du génome mitochondrial sur les propriétés fonctionnelles des mitochondries en fonction des variations de température.

Le premier objectif était d'identifier les différences au niveau des performances mitochondriales et de la thermosensibilité associées à la divergence des mitotypes *sill* et *silll* de *Drosophila simulans* en évaluant l'activité des différentes enzymes de l'ETS à quatre températures différentes grâce à une approche *in vitro* (isolations mitochondriales). Nous avons montré que les différentes enzymes de l'ETS ont différentes thermosensibilités, ce qui peut mener à une distribution différente du contrôle de la respiration par les composantes de l'ETS et par les déshydrogénases en amont de l'ETS à différentes températures. Par exemple, nous avons détecté un excès apparent au niveau du complexe IV d'environ 604% et 613% pour *sill* et *silll* respectivement, mais seulement à basse température (12°C), ce qui nous a amené à penser que cela était dû à un dysfonctionnement des déshydrogénases à basse température.

Le second volet de cette thèse reprenait les mêmes objectifs que le premier. Cependant, pour ce chapitre, une nouvelle méthode (approche *in situ*) a été développée sur des fibres musculaires perméabilisées en utilisant un protocole en respirométrie à haute résolution. Nous avons montré, et ce pour la première fois, que l'approche *in situ* est très appropriée pour évaluer les performances mitochondriales chez des invertébrés et serait même plus pertinente que l'approche *in vitro*. De plus hautes capacités catalytiques des complexes de l'ETS ont été détectées à 24°C pour le mitotype *sill*. Cette capacité catalytique plus élevée pour *sill* peut lui donner un avantage en termes d'intensité du métabolisme aérobie, d'endurance, ou des deux si l'intensité de l'exercice qui peut être effectué au niveau aérobie est dictée par la capacité aérobie du tissu. De plus, les résultats obtenus sur la thermosensibilité ont montré que même si la température affecte les

capacités catalytiques des différentes enzymes de l'ETS, les mitotypes *sII* et *sIII* ont une grande tolérance aux variations de température.

Le troisième volet de cette thèse se concentrait sur l'évaluation du potentiel adaptatif des divergences de l'ADNmt aux quatre températures déjà testées dans les chapitres précédents en utilisant des introgressions. Les performances mitochondriales des haplotypes ainsi créés (*sII*-introgressé et *sIII*-contrôle) ont ensuite été mesurée avec l'approche *in situ*. Nos résultats ont montré que les capacités catalytiques des différentes enzymes de l'ETS dans les organismes introgressés (*sII*-introgressé) étaient quasiment similaires à celles détectées dans le mitotype *sII*, du moins à 24°C. De plus, les différences entre *sII* et *sIII* détectées à 24°C dans le second volet se retrouvent aussi entre *sII*-introgressé et *sIII*-contrôle, dénotant que les propriétés fonctionnelles des mitochondries sont principalement conférées par l'ADN mitochondrial. Cependant, l'impact de la température divergeait entre *sII*-introgressé et *sIII*-contrôle, principalement au niveau de l'excès apparent de COX à 12°C (excès d'environ 193% pour *sIII*-contrôle, mais pas d'excès pour *sII*-introgressé) et au niveau des coefficients de température (Q_{10}) mesurés entre 12 et 18°C. Il est donc possible que les interactions entre ADN nucléaire et ADN mitochondrial soient nécessaires pour permettre aux organismes de faire face aux variations de température. C'est, selon nos connaissances, l'une des premières démonstrations claires du potentiel adaptatif de différents ADNmt sur les propriétés fonctionnelles des mitochondries.

Mots-clés: respiration mitochondriale, système de transport des électrons, interactions mitonucléaires, ADNmt, température.

CHAPITRE I :INTRODUCTION GÉNÉRALE

Mitochondries et métabolisme aérobie

Les mitochondries sont des organites cellulaires essentiels pour la majorité des métazoaires. Elles sont présentes dans le cytoplasme de presque toutes les cellules eucaryotes et leur nombre, leur taille et leur localisation intracellulaire peuvent varier d'une cellule à l'autre. Chaque mitochondrie est entourée de deux membranes hautement spécialisées et ayant des fonctions différentes. Ensemble, elles forment deux compartiments mitochondriaux séparés : la matrice mitochondriale et l'espace inter-membranaire (Fig. 1.1). Bien qu'elles soient impliquées dans de nombreux mécanismes cellulaires, la fonction principale des mitochondries est la conversion d'énergie à partir de la dégradation des nutriments, notamment sous forme d'adénosine triphosphate (ATP) qui est le carburant essentiel à la majorité des réactions endergoniques se produisant dans la cellule. La majeure partie des réactions pour la production d'énergie se déroule au niveau de la matrice et de la membrane interne des mitochondries par l'intermédiaire d'un processus clé appelé phosphorylation oxydative (OXPHOS). Ce mécanisme de transformation moléculaire et de transfert d'énergie nécessite de l'oxygène et c'est pourquoi il s'inscrit dans ce que l'on appelle la respiration aérobie. Le mécanisme d'OXPHOS est accompli par le système de transport des électrons (ETS) et le complexe de l'ATP synthase via l'oxydation de différents substrats carbonés. L'ETS est composé de quatre complexes enzymatiques localisés dans la membrane interne des mitochondries. Ces complexes enzymatiques sont constitués de plusieurs sous-unités protéiques et le transfert des électrons d'un complexe à l'autre tout au long de l'ETS permet la formation d'un gradient électrochimique (gradient de protons) qui, en laissant passer les protons par le complexe de l'ATP synthase permet la production d'ATP.

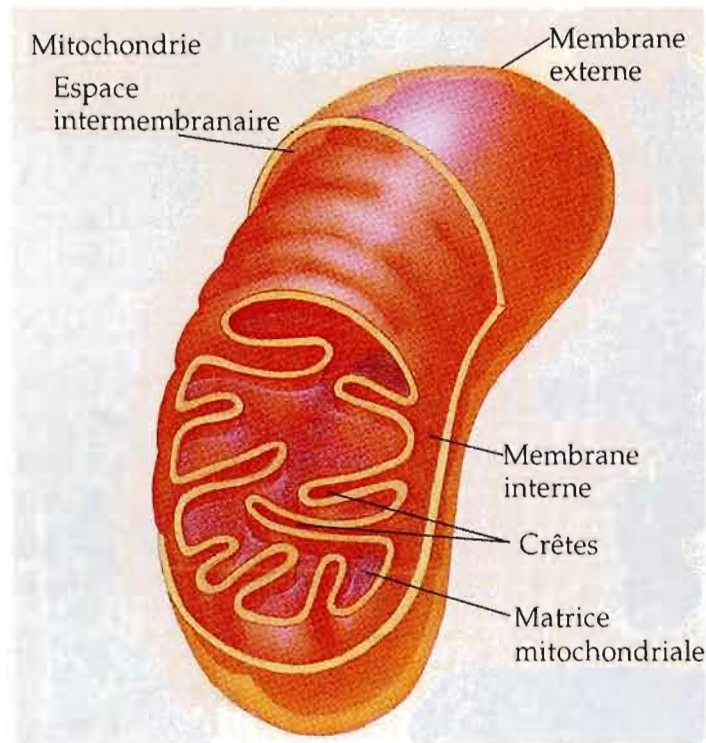


Figure 1.1 Coupe d'une mitochondrie (Tirée de Campbell, 1995).

Système de transport des électrons et convergence à la jonction Q

Les sources de carburant (essentiellement les glucides et les acides gras et occasionnellement les acides aminés) assimilés par l'organisme sont d'abord hydrolysées dans le cytoplasme puis les électrons sont transférés aux équivalents réduits (NADH et FADH_2) par l'intermédiaire du cycle de Krebs (glucides) ou de la β -oxydation (acide gras). Ces équivalents réduits agissent comme donneurs d'électrons qui sont par la suite transférés vers les quatre complexes enzymatiques de l'ETS (Fig. 1.2).

Le complexe I, ou NADH-Coenzyme Q réductase est composé de plus de 40 peptides formant un domaine membranaire et un site de liaison au NADH s'étendant dans la matrice mitochondriale (Wallace, 2007). Ce complexe transfère deux électrons du NADH à l'ubiquinone (Q) permettant ainsi sa réduction en ubiquinol

(QH₂). La molécule de QH₂ diffuse dans la bicouche lipidique et son accumulation constitue la jonction Q (pool d'ubiquinone). Ce transfert d'électrons dans le complexe I permettra l'expulsion de quatre protons par paire d'électron.

Le complexe II, ou succinate-coenzyme Q réductase est quant à lui un complexe enzymatique essentiellement constitué par la succinate déshydrogénase ancrée du côté de la matrice, à la surface de la membrane interne de la mitochondrie. La succinate déshydrogénase est aussi la seule enzyme à faire partie à la fois de l'ETS et du cycle de Krebs. Elle catalyse l'oxydation du succinate en fumarate au niveau du cycle de Krebs et réduit le FAD en FADH₂, permettant ainsi le transfert de deux électrons du FADH₂ à l'ubiquinone. L'ubiquinone ainsi réduite en ubiquinol diffusera dans la membrane interne jusqu'à la jonction Q.

Les électrons ne sont pas transférés, comme on pourrait le penser, du complexe I vers le complexe II. Les électrons peuvent en fait être transférés du complexe I au complexe III ou alors du complexe II au complexe III via la jonction Q. Ce complexe, aussi parfois appelé coenzyme Q-cytochrome *c* réductase ou complexe cytochrome bc₁, catalyse l'oxydation de l'ubiquinol en ubiquinone et permet le transfert des électrons au cytochrome *c*. Ainsi, le complexe III met en jeu un cycle appelé communément le cycle Q grâce à l'intervention de deux centres de réaction pour l'ubiquinone, le centre o et le centre i, situés dans la membrane interne de la mitochondrie. Du côté de l'espace intermembranaire, deux molécules de QH₂ sont oxydées en Q par le centre o. Chaque molécule de QH₂ donne un électron au cytochrome *c* du côté de l'espace intermembranaire et un électron au centre i (via le cytochrome b) du côté de la matrice mitochondriale, assurant ainsi la régénération de la forme oxydée Q qui peut, par la suite, accepter de nouveaux électrons. Chaque paire d'électrons transférée de l'ubiquinol au cytochrome permet ainsi le pompage de quatre protons dans l'espace intermembranaire alors que deux protons sont enlevés de la matrice mitochondriale.

Le complexe IV, ou cytochrome *c* oxydase (COX) permet la dernière étape du transport des électrons. Ce complexe accepte quatre électrons du cytochrome *c* et

les transfère au dernier accepteur de l'ETS, l'oxygène moléculaire (O_2) qui est ainsi réduit en eau. Pour les quatre électrons transférés à la COX, quatre protons sont consommés pour réduire O_2 en H_2O .

Le passage de 2 électrons dans chacun des complexes de l'ETS permet ainsi le transfert de 4 protons dans l'espace intermembranaire au niveau du complexe I, 4 protons au niveau du complexe III et 2 protons au niveau du complexe IV. Un gradient électrochimique est formé et, du fait de l'imperméabilité de la membrane interne aux protons, ceux-ci reviennent dans la matrice mitochondriale par la sous-unité F_0 de l'ATP synthase. Ce passage de protons de l'espace intermembranaire vers la matrice procure l'énergie nécessaire à la synthèse d'ATP, catalysée par la sous-unité F_1 (ATPase) de l'ATP synthase. L'ATP ainsi formé pourra être transféré dans le cytosol grâce au système de transport ATP/ADP translocase (ANT : adénine nucléotide translocase) et pourra être utilisé par les cellules.

Comme nous l'avons dit précédemment, les électrons passant par le complexe I ou le complexe II sont transférés à la jonction Q, qui ensuite les transportera jusqu'au complexe III. D'autres substrats oxydés par des déshydrogénases mitochondriales vont pouvoir transférer des électrons à la jonction Q sans passer par le complexe I ou II. Par exemple, dans la première étape de la β -oxydation, l'acétylcoenzyme A (AcétylCoA) déshydrogénase transfère les électrons des acides gras oxydés au FAD qui les transporte à une flavoprotéine (ETF : electron-transferring flavoprotein). L'ETF apporte les électrons jusqu'à une enzyme, l'ETF ubiquinone oxydoréductase, qui les transférera à son tour à la jonction Q.

De même, le glycérol-3-phosphate (G3P) est oxydé par la glycérol-3-phosphate déshydrogénase (G3Pdh) mitochondriale. Cette enzyme est une flavoprotéine localisée sur la face externe de la membrane interne mitochondriale qui, comme la succinate déshydrogénase, transfère les électrons jusqu'à la jonction Q.

Il est possible d'estimer le flux d'électrons dans l'ETS grâce à l'évaluation de la concentration du dernier accepteur du système, l'oxygène moléculaire, en fonction de l'oxydation des différents substrats énergétiques. En effet, les électrons

convergent vers cet accepteur ce qui permet sa réduction en deux molécules de H_2O . Cependant, pour être totalement réduit, l' O_2 doit accepter 4 électrons. Il se peut donc qu'il soit partiellement réduit, selon le nombre d'électrons. Cette réduction partielle peut mener à la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS : reactive oxygen species) qui peuvent réagir avec des macromolécules, ce qui peut amener à des conséquences dévastatrices pour les cellules.

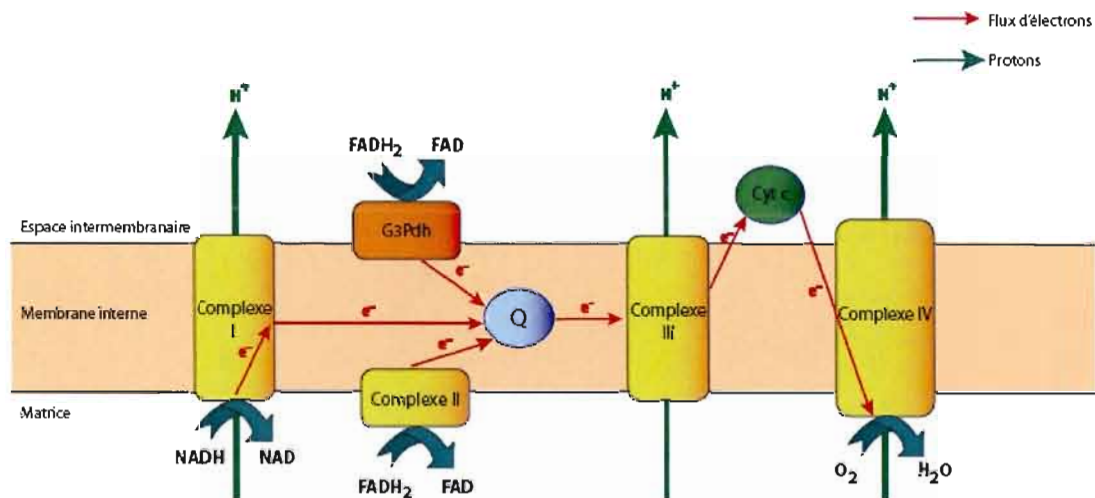


Figure 1.2 Convergence des électrons au niveau de la jonction Q. Des électrons en provenance du Complexe I, du Complexe II et de la Glycérol-3-phosphate déshydrogénase mitochondriale convergent à la jonction Q. Les électrons sont ensuite transférés séquentiellement au Complexe III, au Cytochrome c, au Complexe IV et enfin à l' O_2 . Cela permet le transfert de protons (H^+) de la matrice vers l'espace intermembranaire par l'intermédiaire du Complexe I, du Complexe III et du Complexe IV.

Les espèces réactives de l'oxygène

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont dérivées de l'oxygène moléculaire et sont largement impliqués dans les processus de vieillissement (Harman, 1956; Beckman et Ames, 1998). Ces molécules sont considérées comme des sous produits normaux du métabolisme aérobie et sont impliquées dans

plusieurs fonctions physiologiques importantes telles que l'apoptose, le développement, la prolifération cellulaire, les signaux de transduction et les fonctions immunitaires (Boveris et Cadenas, 2000; Turrens, 2003) et peuvent altérer la structure des constituants cellulaires. Il est dorénavant reconnu que les ROS sont principalement produits par les mitochondries. Entre 0.1 et 4 % de l'oxygène utilisé par ces dernières serait détourné vers la production de ROS (Beckman et Ames, St-Pierre et al., 2002; 1998; Miwa et al., 2003). Ils sont plus précisément formés majoritairement au niveau de l'ETS (Ballard, 2005). La réduction de l'oxygène (en tant qu'accepteur final de la chaîne de transport des électrons) en eau nécessite l'apport de quatre électrons (Beckman et Ames, 1998). Or, des réductions à un seul électron, produisant des anions superoxyde, peuvent aussi survenir. L'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) constitue le précurseur de la plupart des ROS et induit des réactions oxydatives en chaîne. La production de cet anion augmente en présence d'inhibiteurs du complexe I (roténone) et du complexe III de l'ETS (antimycine A) et, généralement, lorsque les composantes de cette chaîne sont dans un état très réduit (Abele et al., 2002). La production de ROS pourrait aussi dépendre davantage du gradient de protons que de la vitesse de transfert des électrons entre les complexes. Ainsi, lorsque le gradient est élevé, les complexes ont plus de difficultés à transférer les protons dans l'espace inter-membranaire, ralentissant ainsi le transfert (ce qui augmente l'état réduit de chaque complexe). Dans ce cas, les électrons ont plus de temps pour rencontrer une molécule d'oxygène et créer un anion $O_2^{\cdot-}$. Des protéines découplantes qui permettent de diminuer le gradient de protons, sans phosphorylation, peuvent assurer une diminution de la production de ROS (Brand et al., 2004; Crisculo et al., 2005).

La dismutation de l' $O_2^{\cdot-}$, de façon spontanée ou par l'intermédiaire d'une enzyme antioxydante (la superoxyde dismutase, SOD) à la fois du côté de l'espace intermembranaire (SOD exogène) et du côté de la matrice mitochondriale (Manganèse-SOD, endogène), produit du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Fig.1.3), qui peut, à son tour, être complètement réduit en eau par une autre enzyme antioxydante (la catalase, CAT) ou alors partiellement réduit en radical hydroxyle

(OH \cdot), l'oxydant le plus puissant parmi ceux observés dans les systèmes biologiques (Turrens, 2003). Ce dernier attaque non spécifiquement toute molécule biologique, ce qui diminue son pouvoir de dispersion. Le peroxyde d'hydrogène n'est pas un radical libre mais joue un rôle oxydant ou réducteur dans plusieurs fonctions physiologiques. À l'inverse de O $_2^{\cdot-}$, le H $_2$ O $_2$ diffuse aisément à travers les membranes et les compartiments aqueux. Ces deux ROS sont considérés comme les moins toxiques mais ils ne sont pas à négliger puisqu'ils conduisent à la formation de radicaux OH \cdot (Solomons et Fryhle, 2000), notamment du fait de la présence de métaux tels que le fer et le cuivre par l'intermédiaire des réactions de Fenton et d'Haber-Weiss.

Les complexes I et III, et la glycérol-3-phosphate déshydrogénase mitochondriale dans les tissus adipeux bruns et les muscles d'insectes, sont reconnus comme les principaux producteurs de ROS (Chen et al., 2003; Brand et al., 2004; Kudin et al., 2004; Miwa et Brand, 2003). Les mécanismes de production par le complexe I de mitochondries isolées semblent bien compris (la production de l'anion superoxyde s'y produirait par l'activité de la forme réduite de la flavine) alors que ce n'est pas encore le cas des mécanismes présents dans des mitochondries intactes (Lambert et Brand, 2007). Néanmoins, on reconnaît que ce complexe forme des anions superoxydes exclusivement du côté de la matrice mitochondriale (Miwa et Brand, 2003), alors que 70% des anions superoxydes produits par le complexe III le seraient dans la matrice alors que les 30% restants le seraient dans le cytosol (Miwa et Brand, 2003). Récemment, Murphy (2009) a démontré que le complexe I produisait une grande quantité d'anion superoxyde par l'intermédiaire de deux mécanismes : lorsque le ratio NADH/NAD $^+$ au niveau de la matrice est élevé, menant ainsi à la réduction du site de la FMN (flavine mononucléotide), ainsi que lorsque le transfert d'électron au pool d'ubiquinone est couplé à un gradient protonique (Δp) élevé, menant à un flux inverse d'électron (reverse electron transport). De même, il a aussi démontré que le complexe III produisait des anions superoxyde, mais seulement en présence d'antimycine A (inhibiteur du complexe III) alors qu'en conditions physiologiques normales, ce complexe n'en produirait qu'une

quantité négligeable.

La production de ROS par la glycérol-3-phosphate déshydrogénase mitochondriale reste aussi un phénomène peu étudié. Les sites de la flavine, du complexe Fe-S et de la semiquinone pourraient tous être impliqués. De récentes études ont démontré que la production de ROS était à moitié cytosolique et à moitié matricielle (Miwa et Brand, 2003; Fig. 1.3) et serait due en grande partie au flux d'électron inverse, bien qu'une partie serait aussi produite par la glycérol-3-phosphate du côté de l'espace intermembraire (Miwa et al., 2003; Tretter et al., 2007; Murphy, 2009).

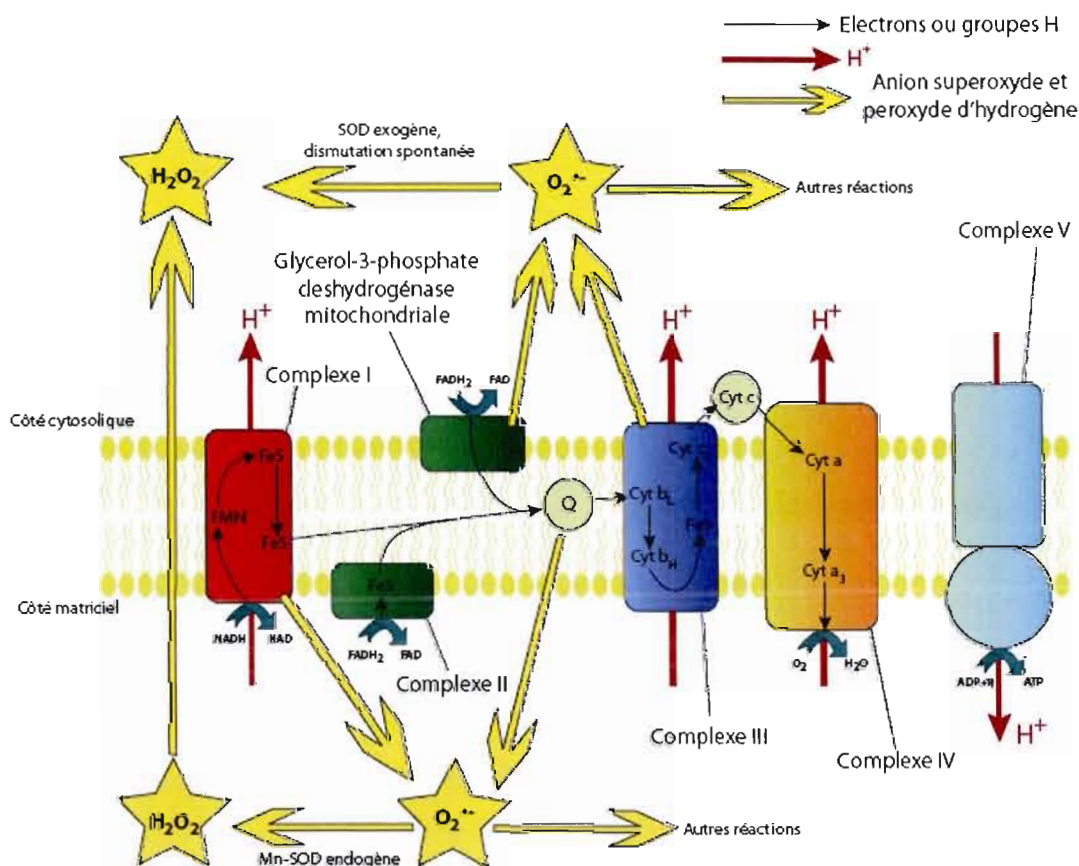


Figure 1.3 Transport des électrons et production de superoxyde dans les mitochondries de *Drosophila* (Adaptée de Miwa et Brand, 2003).

Les trois grandes classes de macromolécules biologiques (lipide, protéine et acide nucléique) sont toutes susceptibles de subir des attaques oxydantes par les ROS.

Par exemple, les chimistes reconnaissent depuis fort longtemps que l'odeur et le goût acre des vieux aliments proviennent de l'oxydation des lipides (Baynes, 2002). En fait, les acides gras polyinsaturés des lipoprotéines et des phospholipides membranaires sont particulièrement sensibles à cette peroxydation (Bokov et al., 2004). Le radical OH^\cdot génère un hydroperoxyde lipidique (LOOH) plutôt que H_2O_2 lorsqu'il réagit avec un lipide : le radical hydroxyle fait abstraction d'un H d'une molécule de lipide et génère un radical libre de lipide L^\cdot , qui réagira avec l'oxygène pour former le radical LOO^\cdot , qui réagit lui-même avec une nouvelle molécule de lipide et générera ainsi LOOH . Ultimement, on retrouve des aldéhydes insaturés (telle que la malondialdéhyde, dont le taux peut être mesuré par les substances réactives de l'acide thiobarbiturique, TBars) qui peuvent agir comme mutagènes et inhibiteurs d'enzymes (Long et al., 2006). Enfin, l'oxydation des lipides altère les propriétés membranaires, en diminue la fluidité et peut briser les liens entre les protéines membranaires et la membrane (Beckman et Ames, 1998). De même, l'oxydation des protéines et l'oxydation de l'ADN mitochondrial joue aussi un rôle important parmi les processus de dommages oxydatifs et donc dans les processus de vieillissement.

Il est donc important de considérer ces ROS lors de l'évaluation de la respiration mitochondriale, notamment par l'intermédiaire de biomarqueurs spécifiques permettant l'estimation du taux de dommages oxydatifs ou tout simplement par la mesure de certaines enzymes impliquées dans la détoxification de ces ROS par les cellules.

Mesure de la respiration mitochondriale

La mesure de la concentration d'oxygène consommée par les mitochondries est

directement reliée au flux d'électrons dans l'ETS. Puisque la phosphorylation oxydative implique le couplage de la synthèse d'ATP avec le transfert des électrons dans l'ETS, il faut s'assurer qu'en plus des substrats énergétiques assurant l'apport en électrons via les équivalents réduits, suffisamment d'ADP et de phosphate inorganique soient présents pour mesurer le taux maximal de respiration mitochondriale. Plusieurs substrats énergétiques sont généralement utilisés afin de mesurer la respiration mitochondriale aux différentes étapes de l'ETS, que ce soit à partir du complexe I, II, III ou IV, de l'ETF ou encore à partir de la glycérol-3-phosphate déshydrogénase mitochondriale. Généralement, les substrats sont oxydés par des déshydrogénases qui transfèrent les électrons aux équivalents réducteurs qui eux, vont approvisionner l'ETS.

Le pyruvate, le malate et le glutamate (ou un de ses précurseur comme la proline) sont utilisés pour stimuler l'entrée des électrons dans l'ETS à partir du complexe I. Le pyruvate est tout d'abord produit par la glycolyse puis transporté dans la matrice mitochondriale où l'action de la pyruvate déshydrogénase (PDH) va catalyser une décarboxylation oxydative libérant de l'AcétylCoA. Le malate va être oxydé en oxaloacétate par l'action de la malate déshydrogénase. La réaction de l'oxaloacétate avec l'acétylCoA génère du citrate qui à son tour sera transformé en α -kétoglutarate par l'isocitrate déshydrogénase. De même, le glutamate est oxydé par la glutamate déshydrogénase en α -kétoglutarate qui intégrera ainsi le cycle de Krebs. Des équivalents réducteurs sous forme de NADH sont formés au niveau de la PDH, de la malate déshydrogénase, de l'isocitrate déshydrogénase, et de l' α -kétoglutarate déshydrogénase et approvisionnent l'ETS en électrons à partir du complexe I. Les électrons sont ensuite transférés à la jonction Q, puis au complexe III, au complexe IV et finalement à l'oxygène.

Le succinate est un substrat utilisé pour favoriser l'entrée des électrons à partir du complexe II. La transformation du succinate en fumarate catalysée par la succinate déshydrogénase va permettre la libération de FADH_2 qui supporte le flux d'électron au complexe II. Ainsi, les électrons transférés au complexe II passeront par la jonction Q et seront ensuite transportés au complexe III, au complexe IV et

enfin à l'oxygène.

De même le glycerol-3-phosphate (G3P) va être transformé en dihydroxyacétone phosphate par la glycérol-3-phosphate déshydrogénase mitochondriale, ce qui va permettre la libération de FADH_2 qui va directement transférer ses électrons à la jonction Q.

D'autres substrats peuvent être aussi utilisés pour favoriser l'entrée des électrons à partir du complexe IV. C'est le cas du N,N,N,N'-tetraméthyl-p-phenylenediamine (TMPD), un transporteur d'électron artificiel qui est réduit en présence d'ascorbate. Les électrons du TMPD réduit sont transférés au cytochrome *c* qui s'oxyde et donne les électrons au complexe IV. Cependant pour que cette combinaison de TMPD et d'ascorbate soit efficace, il faut que l'ETS soit inhibée au préalable au niveau d'un ou de plusieurs (selon les conditions) des complexes en amont.

Le transfert des électrons dans l'ETS peut donc être mesuré en utilisant ces différents substrats spécifiques aux différentes étapes impliquant le complexe I et/ou le complexe II et /ou la glycérol-3-phosphate déshydrogénase ou le complexe IV.

Signification des paramètres mesurés

La mesure de la consommation d'oxygène lors de la respiration mitochondriale permet l'évaluation de divers paramètres qui pourront être interprétés en termes d'efficacité du métabolisme mitochondrial. Les stades de respiration sont l'un de ces paramètres et ont été définis pour la première fois par Chance et Williams (1956) à partir d'expérimentation sur des mitochondries isolées à partir d'hépatocytes de rats. Ainsi, plusieurs stades ayant des significations physiologiques différentes ont été mis en évidence (Tableau 1.1).

Tableau 1.1 Définitions des stades de respiration dans les mitochondries (adapté de Chance et Williams, 1956).

Stades	[O ₂]	Niveau d'ADP	Niveau des substrats	Taux de respiration	Substance limitante
1	>0	Faible	Faible	Lents	ADP et substrats
2	>0	Élevé	≈0	Lents	Substrats
3	>0	Élevé	Élevé	Rapides	ETS
4	>0	Faible	Élevé	Lents	ADP
5	<0	Élevé	Élevé	0	Oxygène

Cependant, lors des 50 années de recherche qui ont suivies, ces définitions ont évolué, même si la plupart des auteurs se réfèrent toujours à Chance et Williams (1956). Par exemple, le stade 2 de la respiration mitochondriale a été défini par Chance et Williams comme étant le stade de repos avec de l'ADP présent mais avant l'addition des substrats. Cependant ce stade correspond en réalité à une phase où tous les substrats endogènes ont été épuisés durant la phase d'activation par l'ADP. Une nouvelle convention a donc été proposée à partir de l'ordre typique d'addition des agents durant une expérimentation (Tableau 1.2, Nicholls et Ferguson, 2002).

Tableau 1.2 Définitions des stades respiratoires. Convention proposée à partir de l'ordre typique d'addition des agents durant une expérimentation (Tiré de Nicholls et Ferguson, 2002).

Stades	Définitions
Stade 1	Mitochondries seules, en présence de phosphate
Stade 2	Substrats ajoutés, respiration faible due au manque d'ADP
Stade 3	Ajout d'ADP, augmentation du taux de respiration
Stade 4	Tout l'ADP est converti en ATP, la respiration ralentie
Stade 5	Anoxie

Malgré le fait que la définition de ces stades soit encore grandement débattue, la plupart des chercheurs s'accordent sur les définitions suivantes que nous allons préciser (Fig. 1.4).

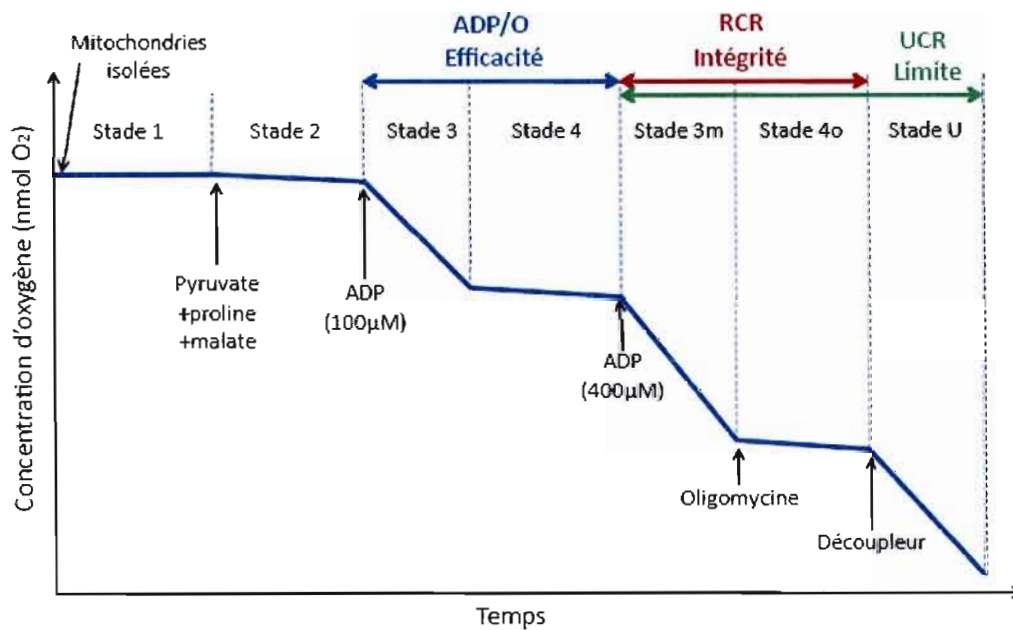


Figure 1.4 Différents stades de respiration obtenus par l'ajout de différents substrats dans des mitochondries isolées. ADP/O Efficacité : efficacité de la phosphorylation oxydative ; RCR Intégrité : ratio du contrôle de la respiration indicateur de l'intégrité fonctionnelle des mitochondries ; UCR Limite : ratio de contrôle de la respiration découplée indicateur de la possible limitation de l'ATPase et de l'ANT sur la capacité de phosphorylation oxydative.

Le stade 1 a lieu dans un contexte cellulaire où les mitochondries sont présentes avec du phosphate, sans substrats ni ADP. Le stade 2 représente l'état physiologique dans lequel les substrats énergétiques sont présents mais l'ADP est toujours absent. À ce stade on observe une faible consommation d'oxygène due au manque d'ADP. Le stade 3, quant à lui, est obtenu après l'addition d'ADP, ce qui résulte en une forte augmentation du taux de respiration. Le stade 4 est alors atteint lorsque tout l'ADP ajouté pour atteindre le stade 3 a été converti en ATP, ce qui résulte en la diminution de la consommation d'oxygène. Pour que le stade 4 soit

atteint, il y a plusieurs possibilités. Tout d'abord, il peut être mesuré lorsqu'une concentration d'ADP plus faible que les concentrations physiologiques (environ 100 μ M) est ajoutée pour atteindre le stade 3. Ainsi le stade 4 est atteint dans un délai raisonnable, lorsque la totalité de l'ADP est convertie en ATP. Cependant, pour maintenir un taux de respiration maximal lors du stade 3 (stade 3m), il est nécessaire d'ajouter de plus grandes concentrations d'ADP afin d'assurer un excès d'ADP tout au long de l'expérimentation. Cet ajout permet de complexifier les protocoles et d'effectuer, par exemple, des titrations de substrats et d'inhibiteurs, i.e. qui assure un maximum d'information à partir d'une seule incubation. Dans ce cas, le stade 4 peut alors être mesuré après l'ajout d'un inhibiteur de l'ATPase comme l'oligomycine (stade 4o). Un autre stade peut être considéré à partir du stade 3 afin de savoir si l'ATPase exerce une limitation sur la respiration mitochondriale. Il s'agit du stade de découplage (stade 3u) qui est atteint après l'addition lors du stade 3m de découpleurs protonophores (tels que le carbonylcyanide-p-trifluorométhoxyphénylhydrazone, FCCP ou le 2,4-dinitrophénol, DNP) et qui permet d'estimer la capacité du système de transport des électrons lors d'un flux maximal d'oxygène (Gnaiger, 2009). Cependant tous ces stades de respiration peuvent être mesurés seulement si les mitochondries sont intactes. Si elles sont endommagées, le couplage du transfert de protons à la phosphorylation de l'ADP peut faire défaut. Cela peut être vérifié par l'addition de cytochrome *c* lors du stade 3 : si une augmentation significative du stade 3 est dénoté après l'injection de cytochrome *c*, cela veut dire que l'intégrité fonctionnelle de la membrane interne des mitochondries a été perturbée et donc que les conditions physiologiques ne sont pas respectées.

Grâce à ces différentes mesures des taux de respiration, plusieurs paramètres peuvent donc être considérés. Tout d'abord, le stade 3m représente la capacité catalytique maximale mesurée au niveau des différents complexes (selon les substrats énergétiques utilisés) du système de transport des électrons. Lorsque le stade 3 est induit par une petite concentration en ADP, le stade 4 est rapidement atteint et il est alors possible d'évaluer l'efficacité mitochondriale en mesurant les ratios ADP/O qui représentent la relation entre la synthèse d'ATP et l'oxygène

consommé. Ces ratios peuvent être calculés grâce à des régressions linéaires à partir du stade 3 et du stade 4 permettant ainsi l'estimation de la consommation d'oxygène en fonction du temps, pour une concentration d'ADP préalablement établie. Si l'intégrité mitochondriale est altérée, la consommation d'oxygène durant le stade 4 se rapproche de la consommation d'oxygène du stade 3. Le couplage des mitochondries peut donc être vérifié par le ratio de contrôle de la respiration (RCR) défini conventionnellement comme le taux de respiration activé par l'ADP (stade 3 ou stade 3m) divisé par le taux de respiration en stade contrôlé sans phosphorylation de l'ADP (stade 2 ou stade 4 ou stade 4o). En absence d'activité de l'ATPase, le même taux de respiration est, en principe, mesuré au stade 2, au stade 4 ou au stade 4o. D'autres ratios apportent d'autres informations sur les propriétés fonctionnelles des mitochondries. Ainsi le ratio de contrôle de la respiration découplée (UCR = stade u/stade 3m) permet de déterminer si la capacité maximale du transport des électrons a été atteinte : l'ajout d'un découpleur permet en effet de court-circuiter le transfert de protons et ainsi d'atteindre une consommation d'oxygène maximale, si celle-ci n'a pas déjà été atteinte grâce à l'oxydation des substrats. De même, le ratio de contrôle des substrats (SCR) qui représente le ratio entre le flux induit par l'addition d'un ou de plusieurs substrats lors du stade 3 divisé par un stade de référence atteint lors du taux maximal de consommation d'oxygène (stade 3m) lorsque les mitochondries sont dans un même état de couplage (avant l'ajout d'un découpleur) permet d'évaluer la contribution de chaque ajout de substrat sur la respiration mitochondriale. Ainsi, lorsqu'un excès d'ADP est utilisé pour atteindre le stade 3m, après chaque ajout de substrats spécifiques à chaque complexe, il est possible de mesurer la capacité catalytique des différents complexes combinés.

Par exemple, l'ajout de pyruvate, de malate et de proline vont provoquer l'entrée des électrons au niveau du complexe I (capacité catalytique du complexe I), l'ajout subséquent de succinate va stimuler le transport des électrons à partir du complexe II et donnera ainsi une indication sur le flux d'électron passant par le complexe I et par le complexe II (capacité catalytique du complexe I + complexe II). Enfin, l'ajout

de G3P provoquera l'entrée des électrons au niveau de la jonction Q via la glycérol-3-phosphate déshydrogénase mitochondriale et permettra l'évaluation du flux arrivant à la jonction Q à partir de trois branches différentes du système de transport des électrons (capacité catalytique du complexe I + complexe II + G3Pdh). Par la suite, l'inhibition des différents complexes du système de transport des électrons permet de la même façon d'évaluer la capacité catalytique relative de plusieurs complexes combinés. Ainsi, la roténone inhibera le complexe I et donnera une indication de la capacité catalytique du complexe II + G3Pdh, le malonate viendra inhiber le complexe II, donnant la capacité catalytique de la G3Pdh et enfin l'antimycine A inhibera le complexe III et donc les électrons ne pourront atteindre l'O₂ ce qui résultera en une diminution de la consommation d'oxygène. Ce taux de respiration représentera alors la consommation d'oxygène résiduelle (Rox) c'est-à-dire la consommation d'oxygène non-induite par la respiration mitochondriale (Gnaiger, 2009).

Une fois les différents complexes du système de transport des électrons inhibés comme expliqué précédemment, l'ajout de TMPD et d'ascorbate permettra de stimuler l'entrée des électrons au niveau du complexe IV et ainsi, l'activité du complexe IV pourra être mesurée. Ce complexe est reconnu comme étant important dans le contrôle de la respiration mitochondriale (Blier et Lemieux, 2001). En effet, il a été démontré que l'activité maximale de ce complexe doit atteindre un certain niveau d'inhibition avant que la respiration mitochondriale ne soit affectée (Letellier et al., 1994). Cet excès de la capacité catalytique du complexe IV a notamment été suggéré comme étant essentiel afin d'assurer le maintien de l'état d'oxydation de l'ETS et de garantir un fort gradient thermodynamique dans l'ETS (Blier et Lemieux, 2001). Il est donc important de prendre ce paramètre en compte lors de la mesure de la respiration mitochondriale.

L'excès apparent de cytochrome c oxydase

En 1986, Wallace a observé un «effet de seuil biochimique» dans des mitochondries atteintes de déficiences au niveau du complexe IV. Cette étude a mené Letellier et al. (1994) à stimuler expérimentalement cet effet en diminuant l'activité du complexe IV grâce à des concentrations croissantes d'inhibiteur spécifique à ce complexe. Ils ont ainsi observé qu'une diminution de l'activité du complexe IV devait excéder une concentration critique d'inhibiteur avant qu'une diminution de la respiration mitochondriale puisse être observée et donc qu'un excès apparent de complexe IV était présent. Il est donc possible d'utiliser des concentrations croissantes d'un inhibiteur spécifique au complexe IV et de mesurer simultanément l'activité individuelle du complexe et la respiration mitochondriale afin de mesurer cet excès. Comparé à la capacité aérobie mitochondriale, cet excès apparent de COX semble être à la base de la haute affinité de l'oxygène de la respiration mitochondriale (Gnaiger et al., 1998). Considérant l'importance du complexe IV dans la régulation et dans l'établissement des capacités catalytiques des mitochondries, il est donc important de mesurer cet excès apparent de COX. Après avoir stimulée l'entrée des électrons au niveau du complexe IV par l'ajout de TMPD et d'ascorbate, une titration à l'azide de sodium (SAZ, inhibiteur du complexe IV) est nécessaire afin d'obtenir la courbe d'inhibition de l'activité du complexe IV en fonction de la concentration en inhibiteur (Fig. 2.1). Parallèlement, une autre courbe peut être obtenue par l'inhibition du stade 3m de la respiration mitochondriale en fonction de la concentration du même inhibiteur. Les courbes de seuil sont obtenues en reportant le flux total en fonction de l'activité de la COX. Le seuil pour l'inhibition de la COX est défini comme l'intersection de la pente initiale avec la régression linéaire de la pente finale. Ainsi, l'excès apparent de COX peut être calculé à partir de l'intersection entre l'axe des ordonnées lorsque l'inhibition de la COX est nulle et l'extrapolation de la régression linéaire de la pente finale (Fig. 2.5, Fig. 3.4 et Fig. 4.4). Ce paramètre nous donnera non seulement une information sur le possible excès apparent de COX mais aussi sur le contrôle qu'exerce le complexe IV sur la respiration mitochondriale.

Analyse de contrôle métabolique et coefficient de contrôle

La théorie du contrôle métabolique stipule que le contrôle de la respiration mitochondriale est partagé entre les différents complexes, que l'importance du contrôle exercé par une enzyme spécifique sur le flux respiratoire est mesurée par son coefficient de contrôle et que la distribution du contrôle entre les différents complexes dépend des taux de respiration (Fell, 1992; Fell, 1997). Ainsi, l'évaluation du coefficient de contrôle (C_i) permet de déterminer le niveau de contrôle d'une enzyme spécifique sur la respiration mitochondriale. Dans le cas de la COX, ce paramètre est important car il est directement relié à l'excès de COX apparent et permet une interprétation plus poussée de ce paramètre. Après avoir obtenu les courbes d'inhibition de la respiration mitochondriale et de l'activité de la COX par titration à l'azide de sodium comme expliqué précédemment, il est possible de calculer une constante d'inhibition (K_i) en transformant les données obtenues antérieurement par une linéarisation de Dickson (Kuznetsov et al., 1996). Puisque l'azide de sodium est un inhibiteur non-compétitif, le coefficient de contrôle peut alors être calculé par l'équation suivante :

$$C_i = -(dJ/J)/(dI/K_i),$$

où J est le flux de la respiration, dJ est la diminution du flux de respiration causée par l'augmentation de la concentration d'inhibiteur dI et K_i est la constante d'inhibition pour l'azide de sodium.

La mesure de tous ces paramètres ainsi que leur interprétation nécessite au préalable que les mitochondries sur lesquelles les mesures sont faites soient évidemment intactes, c'est-à-dire que l'intégrité fonctionnelle de celles-ci doit être préservée. Pour cela, deux méthodes sont largement utilisées.

Isolations mitochondriales et fibres perméabilisées

Un grand nombre d'études existent sur l'évaluation de la respiration mitochondriale chez un grand nombre d'espèces différentes dont *Mya arenaria* (Abele et al., 2002), *Oncorhynchus mykiss* (Blier et Guderley, 1993a), *Salvelinus alpinus* (Blier et Lemieux, 2001), *Manduca sexta* (Chamberlin, 2004), *Fundulus heteroclitus* (Fangue et al., 2008), *Lepidonotothen nudifrons* (Hardewig et al., 1999), *Anarhichas lupus* (Lemieux et al., 2010), et *Mercenaria mercenaria* (Ulrich et Marsh, 2009). Le transport des électrons dans l'ETS menant à la phosphorylation oxydative doit être étudié dans des mitochondries intactes, qui peuvent être isolées à partir de différents tissus. Les procédures standards d'isolation de cet organelle sont basées sur des centrifugations différentielles de tissus ou d'homogénats de cellules permettant une caractérisation *in vitro* précise des propriétés fonctionnelles mitochondriales (Balaban et al., 2005; Kuznetsov et al., 2008). Cette méthode permet, par exemple, d'évaluer précisément l'intégrité fonctionnelle des mitochondries et la capacité maximale de la phosphorylation oxydative *in vitro* (Kuznetsov et al., 2008). Bien qu'ayant fait ses preuves, cette méthode a certains inconvénients. Les propriétés mitochondriales peuvent être perturbées par les processus d'isolation, les résultats obtenus peuvent être biaisés par sélection d'une population mitochondriale spécifique et les méthodes requièrent de grosses quantités de tissus (Kuznetsov et al., 2008). De plus, les interactions cellulaires normales sont perturbées et les isolations mitochondriales ne sont stables que quelques heures, ce qui peut être problématique lors d'une expérience s'étalant sur plusieurs heures.

Une autre méthode pour évaluer la respiration mitochondriale est d'utiliser une approche *in situ* sur des fibres musculaires perméabilisées avec un agent perméabilisant (tels que la saponine ou la digitonine). Ce dernier va interagir avec le cholestérol de la membrane plasmique et ainsi induire la formation de pores, permettant alors l'évaluation des propriétés fonctionnelles des mitochondries dans un environnement proche des conditions physiologiques. Grâce à cette approche *in situ*, les propriétés fonctionnelles des mitochondries peuvent être étudiées dans leur

assemblage et leur position intracellulaire normaux en préservant l'essentiel des interactions avec le cytosquelette (Saks et al., 1998; Milner et al., 2000), avec le noyau (Dzeja et al., 2002) et avec le réticulum endoplasmique (Rizzuto et al., 1998; Csordàs et al., 2006). Ainsi, l'approche *in situ* s'apparente plus aux conditions physiologiques présentes dans une cellule vivante que lors de l'utilisation de mitochondries isolées. Cette méthode est largement utilisée en médecine pour détecter les pathologies mitochondriales par l'intermédiaire de l'acquisition de biopsies. Cependant, à notre connaissance, aucune étude n'utilise cette approche pour l'évaluation de la respiration mitochondriale chez les invertébrés.

Effets généraux de la température sur la respiration aérobie

La température est un facteur crucial qui affecte les processus physiologiques, particulièrement chez les ectothermes qui ne régulent pas leur température corporelle. Au point de vue chimique, une augmentation de la température entraîne une augmentation des vitesses de réaction (Chang et Papillon, 1998) notamment en augmentant l'énergie cinétique des molécules qui interagissent et en favorisant ainsi la rencontre de ces molécules. Tous les processus physiologiques seront donc affectés par les changements de température. Le métabolisme aérobie n'échappe pas au phénomène et va aussi être influencé par les changements de température. Chez les ectothermes, le métabolisme est directement dépendant de la température (Hochachka et Somero, 1984). La diminution du métabolisme aérobie, observée à des températures extrêmes, peut être dictée par les niveaux d'oxygène dans les fluides corporels et par les limites des systèmes circulatoires à assurer un apport suffisant en oxygène à de telles températures. En fait, la capacité aérobie mitochondriale serait limitée par le transport de l'oxygène jusqu'aux mitochondries à faible température alors qu'à haute température, une trop forte demande des mitochondries en oxygène induirait une limitation du transport de l'oxygène (Pörtner, 2002). Les limites fonctionnelles du métabolisme à basse température pourraient aussi être causées par une diminution de la sensibilité aux différents régulateurs

(Blier et Lemieux, 2001). D'ailleurs, une forte diminution de la température réduit significativement la sensibilité mitochondriale à l'ADP (Blier et Guderley, 1993a).

Entre ces extrêmes se trouve la gamme de température à laquelle une espèce est adaptée, et l'on doit s'attendre à y voir une augmentation du métabolisme avec la température. Cependant, chez les espèces adaptées ou acclimatées au froid, le métabolisme (par unité de poids) est souvent plus important que chez les espèces adaptées ou acclimatées à des climats plus tempérés ou tropicaux lorsque celui-ci est mesuré à basse température (Johnston et al., 1994; Berrigan, 1997; Berrigan et Partridge, 1997). À basses températures, on remarque chez certaines espèces une augmentation de la quantité de mitochondries (Pörtner, 2002), ce qui pourrait constituer une réponse pour contrer la perte d'affinité à l'ADP. Cette compensation permet à ces espèces de survivre et de maintenir les processus physiologiques qui seraient autrement nettement ralentis à de telles températures.

L'étude des effets de la température sur la distribution géographique des ectothermes est donc essentielle pour comprendre les adaptations de ces organismes au niveau du métabolisme mitochondrial.

Génome mitochondrial et variations de température

Les complexes de l'ETS sont encodés à la fois par l'ADNmt et par l'ADN nucléaire. Ces complexes sont considérés comme étant influencés par la température, notamment par l'intermédiaire de l'ajustement du processus de phosphorylation oxydative en fonction des conditions environnementales rencontrées par l'organisme (Das, 2006). Étant donné que l'ADNmt code pour 13 peptides impliqués dans la phosphorylation oxydative, il a été suggéré que les pressions sélectives exercées sur l'ADNmt peuvent mener à des haplotypes adaptés à différents environnements. Des études ont suggéré que la pression sélective sur les enzymes de l'ETS peut être dictée par les variations de température (particulièrement chez les ectothermes) et peuvent mener à des changements dans

les sous-unités des complexes de l'ETS codées à la fois par le génome nucléaire et par le génome mitochondrial (Willett et Burton, 2004; Ellison et Burton, 2006).

Contrôle et régulation de la respiration mitochondriale en fonction de la température

Le contrôle du processus de phosphorylation oxydative et de la régulation de la respiration mitochondriale dépend de la capacité des enzymes de l'ETS à moduler leurs activités selon les conditions. Il est donc essentiel de mesurer la sensibilité thermique des complexes de l'ETS afin de mettre en évidence les effets de la température sur le métabolisme mitochondrial puisque la température affecte obligatoirement les capacités catalytiques de ces enzymes.

Une approche, nommée « top-down control analysis », suppose que le contrôle de la phosphorylation oxydative et la régulation de la respiration sont partagés entre différents sous-systèmes ayant un intermédiaire commun et unique, la force proton motrice. Ces sous-systèmes sont le bloc du système d'oxydation des substrats (comprenant la PDH, le cycle de l'acide citrique, l'ETS et les transporteurs de métabolites), le bloc de fuite des protons et le bloc de la phosphorylation oxydative. Cette approche a permis notamment de décortiquer les effets de la température chez le ver à tabac *Manduca sexta* (Chamberlin, 2004). Dans cette étude, les analyses ont révélé que la température provoque des changements de respiration mitochondriale (au niveau du stade 3 induit par le succinate et la présence d'ADP) qui sont principalement dictés par le système d'oxydation des substrats, c'est-à-dire en amont de l'ETS. Cette approche présente un certain intérêt mais ne permet cependant pas de déterminer quelles réactions parmi celles impliquées dans l'oxydation des substrats dictent la thermo-sensibilité de la respiration mitochondriale.

Il est donc important de considérer les capacités catalytiques des différentes enzymes de l'ETS ainsi que l'activité de certaines enzymes clés (telles que la PDH)

à différentes températures afin de mieux comprendre la gestion du contrôle et la régulation de la respiration mitochondriale et possiblement les adaptations aux températures environnementales. La mesure de la respiration mitochondriale et du flux d'électron à différentes températures permettraient de déterminer les caractères métaboliques associés à un haplotype mitochondrial en fonction des variations de température. Le meilleur moyen de procéder est donc de comparer les paramètres cités précédemment chez des populations ayant des haplotypes divergents au niveau de l'ADNmt et une distribution ou une écologie contrastée. Cependant peu d'espèces présentent suffisamment de variabilité naturelle au niveau de l'ADNmt.

***Drosophila simulans*, un modèle biologique unique**

Il existe une espèce possédant une importante variabilité intraspécifique au niveau de l'ADNmt; *Drosophila simulans*. Chez cette espèce, on trouve trois haplotypes mitochondriaux géographiquement subdivisés (sI, II et III), avec 3 % de divergence inter-groupe et 0.06% de diversité intra-groupe (James et Ballard, 2003; Ballard, 2005; Tableau 1.3).

Cette divergence produit un fort pouvoir analytique pour déterminer les effets spécifiques de l'ADNmt sur différents processus physiologiques. *D. simulans* a été décrite pour la première fois, en 1919 par Alfred Sturvenant. *D. melanogaster* et *D. simulans* ont probablement partagé un ancêtre commun il y a entre deux et trois millions d'années. Aujourd'hui, il existe environ 141 espèces connues parmi le groupe *melanogaster* qui sont divisées en onze sous-groupes (Lemeunier et Ashburner, 1984). Le sous-groupe *melanogaster* comprend les espèces *melanogaster*, *sechellia*, *mauritiana* et *simulans*. Les croisements à l'intérieur de ce sous-groupe produisent une descendance plus ou moins stérile : les mâles sont généralement stériles alors que les femelles sont généralement fertiles. En fait, il semblerait que *D. simulans* et *D. mauritiana* soient moins isolées les unes des autres qu'elles ne le sont de *D. sechellia*. Aussi, *D. melanogaster* serait l'espèce la plus isolée par rapport aux trois autres (Lachaise et al., 1986). Enfin, il semblerait

que les deux espèces insulaires *sechellia* et *mauritiana* découleraient d'une population continentale de *D. simulans* (Kliman et al., 2000).

Tableau 1.3 Nombre (Totaux) et pourcentage (%) de nucléotides et d'acides aminés variants dans l'ADNmt de *Drosophila simulans* (*D. sim.*) (*sI*, -II, -III) et *Drosophila melanogaster* (*D. mel*) (Tiré de Ballard, 2005).

	Nucléotides		Acides aminés	
	Totaux	%	Totaux	%
Intrahaplogroupe				
<i>sI</i>	5.83	3.90×10^{-4}	2.00	5.40×10^{-4}
<i>sII</i>	4.78	3.20×10^{-4}	2.29	6.17×10^{-4}
<i>sIII</i>	0.59	4.00×10^{-5}	0.25	6.80×10^{-5}
Interhaplogroupe				
<i>sI</i> vs. <i>sII</i>	392.05	2.60×10^{-2}	47.57	1.28×10^{-2}
<i>sI</i> vs. <i>sIII</i>	345.01	2.30×10^{-2}	26.68	7.2×10^{-3}
<i>sII</i> vs. <i>sIII</i>	305.26	2.04×10^{-2}	45.11	1.21×10^{-2}
Intraspécifique				
<i>D. sim.</i>	236.068	1.58×10^{-2}	26.84	7.25×10^{-3}
<i>D. mel.</i>	53.061	3.5×10^{-3}	10.00	2.70×10^{-3}
Interspécifique				
<i>D. sim.</i> vs. <i>D. mel.</i>	605.33	4.06×10^{-2}	89.89	2.4×10^{-3}

Les trois haplotypes de *D. simulans* ne sont pas répartis uniformément sur la planète. On trouve *sI* à Hawaï, en Nouvelle Calédonie, à Tahiti et aux Seychelles. Cet haplotype est le seul à ne pas vivre en sympatrie avec un autre haplotype. Les haplotypes *sII* et *sIII* se trouvent, en sympatrie, principalement à l'est du continent africain (Ballard, 2005). Dans ces régions, on trouve l'haplotype *sIII* dans une fréquence d'environ 40 % (Ballard, 2004; Fig. 1.4).

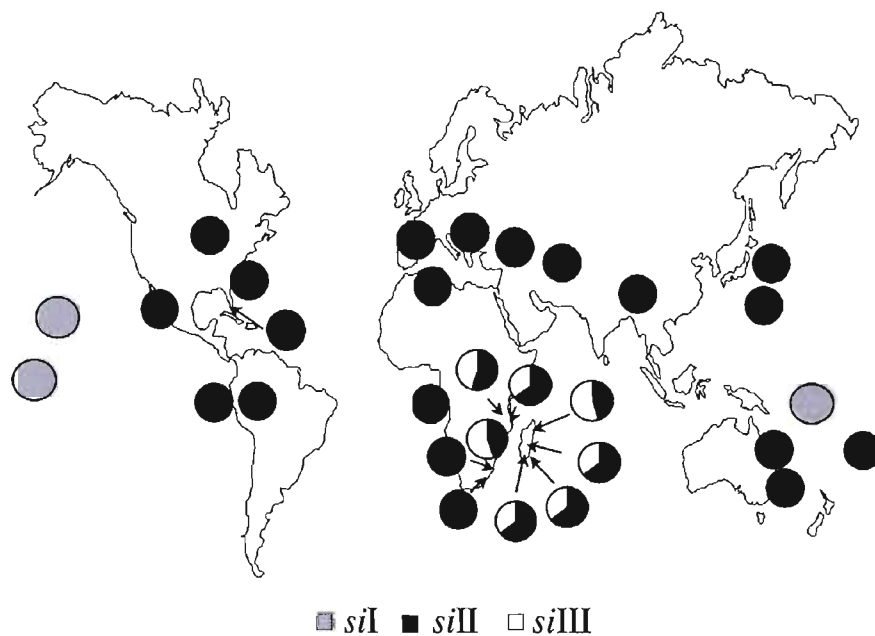


Figure 1.5 Fréquences des haplogroupes d'ADNmt de *D.simulans* (quand plus de 20 individus ont été collectés à partir d'un seul site et pendant une seule période d'échantillonnage) (Tirée de Ballard, 2004).

Enfin, l'utilité de ce modèle est aussi supportée par le fait que le génome mitochondrial et le système de transport des électrons sont fortement conservés chez la drosophile (Ballard, 2005). En plus, son temps de génération très court, sa facilité d'élevage et de manipulation expérimentale et génétique en font un modèle exceptionnel pour l'avancement des connaissances sur la gestion du métabolisme mitochondrial en fonction des variations de température.

À ce jour, plusieurs études ont observé des différences entre les haplotypes au niveau du fitness, de certains traits d'histoire de vie (James et Ballard, 2003; Ballard et al., 2007), de la production mitochondriale de ROS, de la consommation d'O₂ lors de la respiration mitochondriale, de la capacité de la cytochrome *c* oxydase et de l'ATPase (Katewa et Ballard, 2007). Cependant, ces études sont incapables d'identifier la cause véritable de cette variation entre les haplotypes. Étant donné que les complexes enzymatiques du système de transport des électrons sont codés

à la fois par l'ADN nucléaire et l'ADNmt (à l'exception du complexe II), les différences observées entre les haplotypes peuvent être induites par des divergences entre les haplotypes mitochondriaux, par des divergences au niveau des gènes nucléaires qui produisent les protéines qui sont importées dans la mitochondrie ou, plus simplement, par les interactions mitonucléaires.

Une étude a démontré que les mouches dans lesquelles les mitochondries avaient été déplacées par celles d'un autre haplotype étaient grandement désavantagées par rapport à celles qui avaient conservées leur haplotype original (Nigro, 1994). Plus tard, il a été démontré que lorsque les interactions mitonucléaires étaient brisées, une diminution importante de l'activité des mouches était observée (James et Ballard, 2003). Sachant qu'en brisant ces mêmes interactions, une chute drastique de la capacité des complexes enzymatiques de la chaîne de transport des électrons chez *Tigriopus californicus* était observée (Ellisson et Burton, 2006), ces résultats semblent suggérer que les différences métaboliques observées entre les haplotypes de *D. simulans* pourraient être aussi influencées par les interactions mitonucléaires. Il serait donc important d'examiner et de confirmer l'origine de ces différences métaboliques dans le but de mieux comprendre l'effet de la variabilité de l'ADNmt (et des interactions mitonucléaires) sur le métabolisme mitochondrial lors de variations de température.

Objectifs du projet

L'objectif général de cette thèse est d'essayer de relier la divergence des génomes mitochondriaux avec les variations des propriétés fonctionnelles des mitochondries en fonction des changements de température.

Le premier objectif de cette thèse se concentre sur l'identification des performances mitochondriales et de la thermo-sensibilité associée aux divergences de l'ADNmt chez deux populations de *Drosophila simulans*, une possédant l'haplotype *sII* et l'autre, l'haplotype *sIII*. Particulièrement, nous nous sommes

intéressés à l'activité de différents paramètres métaboliques mesurés à quatre températures différentes (12°C, 18°C, 24°C et 28°C) sur des mitochondries isolées à partir de muscle thoraciques. La thermo-sensibilité de la respiration mitochondriale a été mesurée en utilisant du pyruvate, du malate et de la L-proline en tant que substrats permettant de réduire le complexe I, et en utilisant du sn glycérol-3-phosphate afin de réduire le complexe III via la glycérol-3-phosphate déshydrogénase mitochondriale. Nous avons aussi déterminé la thermo-sensibilité d'une des enzymes du cycle de l'acide citrique (citrate synthase, CS), celle de l'activité de la COX, de la respiration découplée et de l'OXPLOS (ratios ADP/O) ainsi que l'excès apparent de COX lors d'un flux élevé d'électrons dans l'ETS (avec pyruvate + malate + proline + sn glycerol-3-phosphate) en utilisant des titrations d'inhibiteur spécifique au complexe IV (azide de sodium) afin de comparer les performances mitochondriales des deux haplotypes à différentes températures. Enfin, les activités enzymatiques de la CAT (enzyme antioxydante), de l'aconitase (ACO, enzyme du cycle de l'acide citrique) et les taux de TBars (marqueurs de la peroxydation lipidique) ont été mesurées afin d'évaluer l'intensité du stress oxydant.

Le **deuxième objectif** était de vérifier si une approche *in situ* permettait une meilleure résolution pour la mesure de la respiration mitochondriale et de comparer les résultats avec ceux obtenus à partir de la méthode employée dans le premier chapitre (mitochondries isolées). La respiration mitochondriale a été mesurée aux quatre températures (12°C, 18°C, 24°C et 28°C) sur des fibres perméabilisées des deux haplotypes différents lors d'un flux élevé d'électrons dans l'ETS. Pour cela, nous avons utilisé un protocole appelé « multiple substrate-uncoupler-inhibitor titration » (SUIT) que nous avons adapté à notre modèle biologique. Ce protocole permet de déterminer le contrôle de la capacité de phosphorylation oxydative et d'explorer les conséquences fonctionnelles d'une convergence des voies métaboliques au niveau de la jonction Q (Gnaiger, 2009). Nous avons donc mesuré à partir de ce protocole la thermo-sensibilité de la respiration mitochondriale au niveau du complexe I, du complexe II et du complexe III (via le pool d'ubiquinone) en utilisant une combinaison de divers substrats et les inhibiteurs respectifs des

différents complexes. De même, la thermo-sensibilité de la respiration découplée, de l'activité de COX et de l'excès apparent de COX ont aussi été mesurées. De plus, l'activité de la PDH a aussi été évaluée afin d'examiner l'entrée des électrons dans l'ETS au niveau du complexe I. Tous ces paramètres ont ensuite été comparés aux résultats obtenus avec la méthode utilisée dans le premier objectif.

Le troisième objectif avait pour but de déterminer si les propriétés fonctionnelles des mitochondries étaient conférées par l'haplotype mitochondrial en utilisant des introgressions contrôlées (c'est-à-dire le transfert par générations successives de l'ADNmt d'un haplotype dans l'environnement nucléaire d'un autre haplotype et ainsi briser les interactions mitonucléaires) et en mesurant la respiration mitochondriale par l'approche *in situ* aux quatre températures déjà testées. Les performances mitochondriales et la thermo-sensibilité des différents paramètres mesurés (les mêmes que dans le deuxième chapitre) ont été comparées en utilisant des rétrocroisements entre les deux différents haplotypes de *Drosophila simulans*. Ceci a permis de briser les interactions mitonucléaires et ainsi de déterminer le potentiel adaptatif des divergences de l'ADNmt sur les propriétés fonctionnelles des mitochondries mesurées à différentes températures, considérant que ces propriétés peuvent dépendre des gènes codés par le génome mitochondrial, des gènes codés par le génome nucléaire et/ou des interactions mitonucléaires. Nous avons donc pu mesurer l'effet des haplotypes mitochondriaux et des changements de température sur les capacités métaboliques.

Dans l'ensemble, cette étude contribue à l'acquisition de nouvelles connaissances sur l'effet de l'haplotype mitochondrial sur les propriétés fonctionnelles des mitochondries en fonction des changements de température. De plus, l'établissement d'une nouvelle méthode (approche *in situ*), jamais utilisée chez les invertébrés, a permis de mieux comprendre les phénomènes régissant la modulation et la plasticité du métabolisme mitochondrial en fonction des changements de température chez des ectothermes. Les résultats de ce projet seront donc des éléments clés au niveau de notre compréhension de l'évolution induite par des changements environnementaux sur la production d'énergie.

CHAPITRE II

THERMAL SENSITIVITY OF MITOCHONDRIAL METABOLISM IN TWO DISTINCTS MITOTYPES OF *DROSOPHILA SIMULANS*: EVALUATION OF MITOCHONDRIAL PLASTICITY.

Nicolas Pichaud¹, Etienne Hébert Chatelain¹, J. William O. Ballard², Robert M. Tanguay³, Geneviève Morrow³, and Pierre U. Blier¹

¹ Laboratoire de biologie intégrative, Département de Biologie, Université du Québec à Rimouski, 300 Allée des Ursulines, Rimouski, Québec, Canada G5L 3A1; (N. Pichaud: conception du projet, expérimentation et analyse des données, rédaction de l'article et conception des figures; É. Hébert Chatelain : aide à l'expérimentation ; P. Blier: aide à la conception du projet et supervision et à la rédaction).

² School of Biotechnology and Biomolecular Sciences, University of New South Wales, Sydney 2052, Australia (J.W.O. Ballard: aide à l'élevage et à la rédaction).

³ Laboratoire de Génétique Cellulaire et développementale, Département de Médecine, Institut de Biologie intégrative et des systèmes, 1030 ave de la Médecine, Université Laval, Québec, Canada G1V 0A6 (G. Morrow : aide à l'élevage ; R. Tanguay : aide à l'élevage et à la rédaction).

Paru en 2010 dans *Journal of Experimental Biology*, vol. 213, p. 1665-1675. Les références citées dans l'article sont reportées à la fin de la thèse.

2.0 Résumé

Les objectifs de cette étude étaient (1) de comparer les performances mitochondriales de populations possédant différents haplotypes et différentes distributions, et (2) d'évaluer la sensibilité de différentes enzymes du système de transport des électrons (ETS) lors de variations de température. Nous avons mesuré l'impact de la température au niveau de la respiration mitochondriale et de différentes enzymes clés du métabolisme mitochondrial de deux mitotypes (*sII* et *sIII*) de *Drosophila simulans*. Les effets de changements de température sur la consommation d'oxygène ont été évalués dans des mitochondries isolées à partir des muscles du vol en utilisant des substrats du complexe I (pyruvate + malate + proline) ainsi que du glycérol-3-phosphate (pour réduire le complexe III via la glycérol-3-phosphate déshydrogénase) à la fois au niveau de la respiration couplée et découplée. Les activités de la citrate synthase, de la cytochrome *c* oxydase (COX), de la catalase, de l'aconitase ainsi que l'excès apparent de COX lors d'un flux élevé d'électrons dans l'ETS ont aussi été mesurés en fonction de la température. Nos résultats ont montré que les différences fonctionnelles mesurées (taux de respiration, ratios ADP/O) entre les deux mitotypes sont faibles. Cela suggère que les différences entre les deux haplotypes mitochondriaux ne peuvent pas expliquer les différences au niveau des performances mitochondriales. Ceci suggère que d'autres facteurs pourraient être responsables de la maintenance des mitotypes. Nous avons aussi montré que les différentes enzymes de l'ETS ont différentes thermosensibilités. Les capacités catalytiques de ces enzymes varient avec les changements de température, et l'excès apparent de COX est faible, parfois même inexistant à températures hautes et intermédiaires (18°C, 24°C et 28°C) alors qu'il est très élevé à basse température (12°C), suggérant un relâchement au niveau du contrôle de la respiration par la COX à basse température dans les deux mitotypes utilisés.

2.1 Abstract

The overall aim of this study was to (1) evaluate the adaptive value of mitochondrial DNA by comparing mitochondrial performance in populations possessing different haplotypes and distribution and to (2) evaluate the sensitivity of different enzymes of the ETS during temperature-induced changes. We measured the impact of temperature of mitochondrial respiration and several key enzymes of mitochondrial metabolism in two mitotypes (*sII* and *sIII*) of *Drosophila simulans*. The temperature dependencies of oxygen consumption for mitochondria isolated from flight muscle was assessed with complex I substrates (pyruvate+malate+proline) and with *sn* glycerol-3-phosphate (to reduce complex III via glycerophosphate dehydrogenase) in both coupled and uncoupled states. Activities of citrate synthase, cytochrome *c* oxidase (COX), catalase, and aconitase, and the excess capacity of COX at high convergent pathway flux were also measured as a function of temperature. Overall, our results showed that functional differences between the two mitotypes are few. Results suggest that differences between the two mitotypes could hardly explain the temperature-specific differences measured in mitochondria performances. It suggests that some other factor(s) may be driving the maintenance of mitotypes. We also show that the different enzymes of the ETS have different thermal sensitivities. The catalytic capacities of these enzymes vary with temperature changes, and the corresponding involvement of the different steps on mitochondrial regulation likely varies with temperature. For example, the excess COX capacity is low, even non-existent, at high and intermediate temperatures (18, 24 and 28 °C) while it is quite high at lower temperature (12 °C), suggesting release of respiration control by COX at low temperature.

2.2 Introduction

MtDNA encodes 13 key peptides of the mitochondrial electron transport system (ETS), and it is therefore suspected to partly evolve to adjust oxidative phosphorylation to environmental conditions of the organism (Das, 2006). For example, mtDNA has been suggested to influence the ability to acclimate to different thermal environments (Blair et al., 2001; Fontanillas et al., 2005) and the thermal sensitivity of mitochondrial complexes could therefore be of major significance in the impairment of the functional properties of mitochondria during temperature changes in ectotherms (Blair and Lemieux, 2001). A good strategy to assess the adaptive value of mtDNA is therefore to compare performances of mitochondria from populations characterised by different haplotypes and contrasting ecology or distribution.

Drosophila simulans, an ectothermic and eurythermic species, was recently proposed as a new model to study the adaptive value of mtDNA: it harbours three distinct geographically subdivided haplogroups (*sI*, *sII*, *sIII*) with nearly 3% interhaplogroup divergence but less than 0.06% intrahaplogroup diversity (Ballard, 2000a; Ballard, 2005). Differences in the functional properties of mitochondrial ETS have been detected between these three lines of *drosophila* with distinct mtDNAs and one of these (*sII*) has been proposed to have a selective advantage (Ballard, 2005; Katewa and Ballard, 2007). These differences have been considered as strong support of mitochondrial genome adaptation.

In ectothermic species, acclimation or acclimatization to low temperature usually increases the activity of enzymes in the oxidative pathway and the mitochondrial volume density (Guderley, 2004). A metabolic limitation at the level of mitochondrial catalytic capacity is thought to be the cause of these responses (for reviews see Pörtner, 2002; Guderley, 2004; Blair et al., 2006). Moreover, metabolic rates of *D. melanogaster* and *D. simulans* coming from populations evolving in low temperature environments are higher than those from populations evolving at higher temperatures (Watada et al., 1986; Berrigan, 1997; Berrigan and Partridge, 1997).

This suggests qualitative or quantitative mitochondrial adaptations in these populations, likely resulting from catalytic or regulatory limitations at low temperatures. Chamberlin (2004), in a study on tobacco hornworm (*Manduca sexta*) midgut mitochondria, tried to identify the steps of the oxidative phosphorylation process that drive the changes in mitochondrial respiration during temperature variation. These results showed that the “substrate oxidation system” (including tricarboxylic acid cycle, electron transport chain and metabolite transporters), which produces the proton-motive force, confers most of the control over mitochondrial respiration during temperature declines. However, Chamberlin’s (2004) study was not able to determine what individual reaction within the subsystems exerts this control. According to Blier and Lemieux (2001), cytochrome *c* oxidase (COX, Complex IV) in trout has a thermal response that is similar to that of mitochondrial respiration. COX was however, generally found in excess in mitochondria and this excess compared to the aerobic mitochondrial capacity is a basis for the high oxygen affinity of the respiration chain (Gnaiger et al., 1998). In this context, thermally-induced changes in COX activity would have little effect on the maximal respiration rate while still acting on regulation of respiration mainly through impact upon the redox state of ETS (Blier and Lemieux, 2001).

However, the control of oxidative phosphorylation and regulation of mitochondrial respiration is highly complex and other parameters of the system may be influenced by temperature. The oxygen property to diffuse, its availability, and its capacity to act as the terminal electron acceptor in the mitochondrial chain for energy production, are also affected by temperature: at low temperature, the aerobic capacity of mitochondria may impose a limit to metabolic capacity whereas at high temperatures, excessive oxygen demand would cause an uncompensated decrease in oxygen levels in body fluids (Pörtner, 2002). At lower temperature, mitochondria likely require a greater availability for ADP to reach a given relative activity than they do at higher temperature since reduced temperatures appeared to decrease mitochondrial sensitivity to control by ADP availability (Blier and Guderley, 1993a).

Temperature alterations can also lead to the formation of Reactive Oxygen

Species (ROS) such as superoxide ($O_2^{\cdot-}$) and hydrogen peroxide (H_2O_2) (Abele et al., 1998). These reactive molecules can oxidize DNA, proteins and lipids (Barja and Herrero, 2000; Das et al., 2001; Bokov et al., 2004), and lead to an oxidative stress when antioxidant enzymes (catalase, glutathione peroxidase and superoxide dismutase) and other non-enzymatic antioxidant compounds are overwhelmed (Beckman and Ames, 1998). These species arise largely, but not exclusively, from the mitochondria (Abele et al., 2002; Keller et al., 2004), which are known as the major ROS producers (Sastre et al., 2000). Unlike the nuclear DNA, histone proteins do not protect mtDNA and there is evidence that mtDNA exhibits more oxidative damage than nuclear DNA (Wei et al., 1998; Barja and Herrero, 2000) because of its closer proximity to ROS production sites and its limited repair mechanisms (Bogenhagen, 1999).

In *Drosophila*, ROS are mostly generated by complex I (NADH dehydrogenase), complex III (cytochrome *bc*) both encoded by mtDNA and nuclear DNA, and by glycerol-3-phosphate dehydrogenase (Chen et al., 2003; Miwa et al., 2003; Andreyev et al., 2005). Katewa and Ballard (2007) showed that there were significant differences between two mitotypes of *D. simulans* (*sII* and *sIII*) for mitochondrial H_2O_2 production but also for O_2 consumption, COX activity and ATPase activity.

Our study is aimed at identifying differences in mitochondrial performance and thermal sensitivity associated with haplotype divergences in the *D. simulans*' *sII* and *sIII* mitotypes. Different parameters of the mitochondrial metabolism were estimated at 12, 18, 24 (considered as an optimal temperature for *Drosophila* species: David, 1988) and 28 °C. The thermal sensitivity of mitochondrial respiration was measured with pyruvate, malate and L-proline as substrates to reduce complex I and with *sn* glycerol-3-phosphate to reduce complex III via glycerol-3-phosphate dehydrogenase. We also determined the thermal sensitivity of an enzyme of the tricarboxylic acid cycle (citrate synthase, CS), as well as that of COX activity. Thermal sensitivity of uncoupled respiration (with carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone: FCCP) and of oxidative phosphorylation (ADP/O ratios), as well as that of the excess capacity of COX at high convergent pathway flux (with pyruvate+malate+proline+*sn*

glycerol-3-phosphate) using inhibitor titration experiments were determined in order to compare overall mitochondrial performances at different temperatures of both mitotypes. Finally, enzyme activities of catalase (CAT, antioxidant enzyme), aconitase (ACO, tricarboxylic acid cycle) and levels of thiobarbituric reactive substances (TBARS, markers of lipid oxidative damages) were measured to evaluate the antioxidant capacity.

2.3 Materials and Methods

2.3.1 Fly lines

Two mitotypes of *D. simulans* were used during experiments: *sII* and *sIII* mitotypes, both from Kenya. In each mitotype, four isofemale lines (namely 2KY0412, 2KY0415, 2KY0418, and 2KY0421 for *sII*; 3KY0410, 3KY0412, 3KY0414, and 3KY0420 for *sIII*) were reared from flies collected in Nairobi (Kenya) during November 2004 as described previously (Ballard et al., 2007). Within the haplotype groups (four *sII* and four *sIII* fly lines) there was low amino acid variation within a 4.5 kb region spanning from positions 1450 to 5983 of the mtDNA genome while significant divergences were noticed ($2.04 \times 10^{-2}\%$ nucleotide divergences, $1.21 \times 10^{-2}\%$ amino acid divergences) between the haplotypes (Ballard, 2000b). This region contains three protein-coding loci of complex IV (COI, COII and COIII) and the two of complex V (ATP6 and ATP8) (Katewa and Ballard, 2007). Moreover, many studies have not been able to detect significant nuclear divergences between the two haplotypes (Ballard, 2000a; Ballard et al., 2002; Dean et al., 2003).

Flies were fed with standard cornmeal medium, containing a mixture of 10 g of agar-agar, 12 g of sugar, 54 g of dried yeast and 106 g of cornmeal flour dissolved in 2 L of tap water. Propionic acid (8 mL) and methyl 4-hydroxybenzoate 10% (w/v) in ethanol (32 mL) were added to the mixture to avoid mite and mold contamination. All *Drosophila* lines were maintained at constant density (100 flies for approximately 25 mL of standard cornmeal medium), temperature (24.0 ± 0.1 °C), humidity (50% R.H.)

and diurnal cycle (12 h light and 12 h dark). For all experiments, only males were selected because females have a large number of mitochondria in abdominal oocytes which could bias experiment measurements. After being allowed to spawn in sterile recipients for two days, parents were removed and experimental flies were then sexed on ice two days after hatching and transferred to new recipients for an additional 8 days prior to study. To avoid fitness problems due to aging, all chosen parents were less than 14 days old and all experimental male flies were 10 days old. Flies were reared in two incubators (A and B) at the same time to have experimental lines replicates and avoid the “incubator” effect. For each recipient of 100 male flies, 40 were used for mitochondrial isolation and others were immediately stored at -80°C for further enzymatic analysis within one month.

Mitochondrial DNA was determined using allele-specific PCR as described previously in each isofemale line (Dean, 2003), and *Wolbachia* infection was verified using conserved 16S rDNA primers (James and Ballard, 2000). According to Ballard et al. (2007) there is only one nonsynonymous change within *sII* lines and one nonsynonymous change within *sIII* lines over 5500 bp analysed. PCR assays showed that all isofemale lines belonged to the corresponding mtDNA haplotype and were not infected by *Wolbachia*.

2.3.2 Fly sampling

Due to the low intrahaplogroup variation (Katewa and Ballard, 2007), we have been able to pool flies of each line from the two groups (*sII* and *sIII*). The pooling strategy minimizes individual differences caused by the nuclear genome of a particular fly line and enables us to detect more general differences that are due to the mtDNA in-of-itself and/or of fixed nuclear differences that interact with each mtDNA haplogroup (Ballard, 2000a; Dean et al., 2003; Katewa and Ballard, 2007). Flies used for mitochondrial isolations were weighed as a pool of the four isofemale lines and from each mitotype while those used for enzymatic analyses were weighed individually with an electrobalance (Mettler Toledo) with a resolution of 0.1 μg . All

flies used for this study were reared in the same conditions and males were weighed at 10 days of age. No weight differences were observed between the different pools of 40 flies ($0.754 \text{ mg} \pm 0.054$ for *sII* incubator A; $0.751 \text{ mg} \pm 0.052$ for *sII* incubator B; $0.748 \text{ mg} \pm 0.052$ for *sIII* incubator A; $0.751 \text{ mg} \pm 0.052$ for *sIII* incubator B), or between flies of the two mitotypes weighed individually (0.670 to 0.831 mg for *sII* both A and B incubators; 0.674 to 0.839 mg for *sIII* both A and B incubators).

2.3.3 Isolation of intact mitochondria

Intact mitochondria were isolated as previously described by Katewa and Ballard (2007). Briefly, flight muscle mitochondria were isolated from 160 thoraxes (40 of each line of each mtDNA type) of 10 days old male *D. simulans*. All steps were done at 4°C . Thoraxes were separated from abdomens and heads and placed in $400 \mu\text{L}$ of isolation buffer containing 250 mM sucrose, 5 mM Tris, 2 mM ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA), 0.1% Bovine Serum Albumin (BSA) (w/v), pH 7.4. Thoraxes were then homogenized with a Kontes polypropylene pellet pestle (Kimbal Kontes, Vineland, New Jersey, USA). The pestle was pressed firmly to the bottom avoiding any grinding action. Thoraxes were pressed 120 times to produce a smooth, grey homogenate. Homogenates were filtered through gauze pad and the volume was raised to 2.1 mL with isolation buffer. After a first 3 minutes centrifugation at 300 g , the supernatant was refiltered through gauze (approximately 1.8 mL final volume) and recentrifuged for 10 minutes at 9000 g . The supernatant was then discarded and the pellet was washed two times in $400 \mu\text{L}$ of isolation buffer before being resuspended in $120 \mu\text{L}$ of the same buffer. The mitochondrial preparations were stored on ice and used within 2 hours of isolation for mitochondrial oxygen measurements, inhibitor titration experiments and aconitase (ACO) activity. Integrity of mitochondrial preparations was verified in preliminary experiments with cytochrome c injection during the respiration state 2 (state 2c). The ratio between state 2 and state 2c measured at 24°C with 7 different mitochondrial preparations gave 0.971 ± 0.061 which confirms high quality of preparation.

2.3.4 Mitochondrial respiration

Mitochondrial oxygen consumption was measured at four different temperatures (12, 18, 24 and 28 °C) using an oxygraph Oxyg 32 (Hansatech Instruments Ltd.) connected to a circulating water bath. Measurements were done in a final volume of 500 μ L at each temperature with 15 μ L of mitochondrial preparation incubated in 485 μ L of mitochondrial respiration medium containing 120 mM KCl, 5 mM KH_2PO_4 , 3 mM HEPES, 1 mM EGTA, 1 mM MgCl_2 and 0.2% BSA (w/v), pH 7.2. The polarographic system was calibrated with nanopure water saturated with oxygen at the incubation temperature.

2.3.4.1 Complex I and III

Pyruvate (10 mM), L-proline (10 mM, pH 7.2) and Malate (10 mM, pH 7.2) were added to the chambers to provide substrates for complex I reduction and to achieve state 2 respiration. *Sn* glycerol-3-phosphate (20 mM, pH 7.2) was used as a substrate to supply electrons to the ubiquinone pool via glycerol-3-phosphate dehydrogenase in order to reduce complex III.

ADP (100 μ M, pH 7.2) supplemented with MgCl_2 (0.6 mol/mol ADP to keep $[\text{Mg}^{2+}]$ constant during respiration measurement) was added to reach state 3 respiration and state 4 was obtained after exhaustion of ADP. These states were used to calculate ADP/O ratios of complex I and complex III (as an index of mitochondrial efficiency). After first exhaustion, ADP (400 μ M, pH 7.2) was introduced again to achieve maximum active state 3 (state 3m) and the state 4o was measured after addition of oligomycin (2 μ g/mL) which inhibits mitochondrial ATPase and phosphoryl group transfer. According to our preliminary tests, this concentration is higher than required to fully inhibit ATPase in mitochondria that have already reached state 4. Respiratory control ratios (RCRs) were calculated as state 3m/state 4o (as an index of functional integrity of mitochondria). FCCP was then added by steps of 0.1 μ M and uncoupled respiration ratio (UCR) was measured as state U/state 3m with state U representing the maximum uncoupled respiration rate (reached between 0.2 and 0.5 μ M of FCCP) to evaluate metabolic flux control by the

phosphorylation system over the electron transport capacity.

2.3.4.2 Azide titration experiment

Following the first experiment, mitochondrial isolations were used to measure oxygen consumption in the presence of pyruvate (10 mM), L-proline (10 mM, pH 7.2), malate (10 mM, pH 7.2) and *sn* glycerol-3-phosphate (20 mM, pH 7.2) insuring high metabolic flux through the ETS. After addition of ADP (800 μ M, pH 7.2, this concentration ensured excess ADP during the entire experimental period and the state 3m reached was not different than with 400 μ M), the following steps of azide concentrations were introduced at appropriate intervals to progressively inhibit complex IV: 1, 2, 7, 12, 32, 52, 102, 202, 702, 1202, 1702 and 2202 μ M, or until maximum inhibition was achieved. The dissociation constant (K_i) was calculated from transformed data using the Dickson linearization (Kuznetsov et al., 1996). As azide is a non-competitive inhibitor, the flux control coefficient (C_i) was calculated using the following equation:

$$C_i = -(dJ/J)/(dI/K_i)$$

where J is the respiration flux, dJ is the decrement of respiration flux caused by increment of inhibitor addition dI (between 0 and 80 μ M), and K_i is the dissociation constant for sodium azide (Kuznetsov et al., 1996).

These steps were repeated for each mitochondrial preparation. Extraction and mitochondrial preparations were performed on five different pools of flies for each incubator, at each temperature, and for each mitotype (total of 80 mitochondrial isolations). Measurements were averaged and respiration rates are expressed in nmol O_2 consumed per minute per mg of mitochondrial protein.

2.3.5 Enzymatic analyses and oxidative stress markers

ACO, CS, CAT activities and protein content were measured using a UV/VIS

spectrophotometer (Perkin Elmer, Lambda 11) and TBARS levels were measured using a fluorescence spectrophotometer (F-2500 from Hitachi) both equipped with a thermostated cell holder and a circulating refrigerated water bath. COX activity was measured polarographically with the same oxygraph as for mitochondrial oxygen consumption. Each measurement was done in duplicate, and for each incubator, at each temperature and for each mitotype, five different analyses were averaged.

ACO was measured on fresh mitochondria. The remaining mitochondria were then frozen at -80°C for further CS analysis and protein content measurement.

For CAT and protein analysis, 12 flies (3 from each isofemale line of each mitotype) were homogenized in 600 μL of ice cold buffer (100 mM KH_2PO_4 , 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 0.1% (v/v) Triton X-100, pH 7.5). In separate preparations, 16 flies (4 from each isofemale line of each mitotype) were homogenized in 400 μL of the same ice cold buffer for malondialdehyde (MDA) assessment and in 400 μL of imidazole buffer (50 mM imidazole, 2 mM MgCl_2 , 5 mM EDTA, 0.09% (v/v) Triton X-100, pH 7.4) for COX activity measurement.

2.3.5.1 Citrate synthase

Mitochondria (1 μL) were transferred in 100 mM imidazole-HCl (pH 8), 0.1 mM 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), 0.1 mM Acetyl CoA and 0.15 mM oxaloacetate. Activities were measured at the four different temperatures by following the increase in absorbance due to the reduction of DTNB at 412 nm ($\epsilon_{412} = 13.6 \text{ ml.cm}^{-1}.\mu\text{mol}^{-1}$) (Thibeault *et al*, 1997).

2.3.5.2 Aconitase

Mitochondria (1 μL) were transferred in 50 mM Tris-HCl, 0.1% Triton X-100 (v/v), 0.6 mM MnCl_2 , 5 mM sodium citrate, 0.2 mM NADP, 0.4 U.mL^{-1} isocitrate dehydrogenase, pH 7.4. Activity was measured at the four temperatures by following the appearance of NADPH at 340 nm ($\epsilon_{340} = 6.22 \text{ ml.cm}^{-1}.\mu\text{mol}^{-1}$) (Miwa and Brand, 2005).

ACO activity was normalized with CS activity and results are expressed in U of aconitase activity per U of citrate synthase activity in order to express the activity of ACO on the mitochondria quantity since CS is a marker of this quantity.

2.3.5.3 Cytochrome *c* oxidase

The reaction medium for COX activity contained 130 mM KCl, 30 mM HEPES, 10 mM KH_2PO_4 , 11 mM MgCl_2 hexahydrate, 20 mM Glucose, 10 mM Ascorbic acid and 5% (w/v) BSA (Blieier and Lemieux, 2001). After homogenates were centrifuged at 750 g for 5 minutes, 5 μL of the supernatant were incubated in respiration chambers with 995 μL of reactive medium. After addition of cytochrome *c* (150 μM), azide was introduced step by step at concentrations described previously (see Azide titration experiment). This method was compared with the classic method of complex IV titration by azide using the same protein concentration in the chambers (Letellier et al., 1994; Villani and Attardi, 1997) with N,N,N',N' -Tetramethyl-*p*-phenylenediamine (TMPD, 1 mM) and Ascorbate (5 mM) as substrates after inhibition of complex I and III with rotenone (0.5 μM) and Antimycin A (2.5 μM) respectively, and activation by ADP (800 μM) and cytochrome *c* (150 μM) addition. Oxidation rates due to autoxidation of TMPD, ascorbate and cytochrome *c* were subtracted from the activity (Gnaiger and Kuznetsov, 2002). Results showed that there were no significant differences for the constant dissociation K_i , for metabolic flux control C_i (Table 2.1), as well as for maximum velocity (V_{\max}) (12.14 $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1} \pm 4.14$ and 14.16 ± 2.73 for *sII* and *sIII* respectively for our method; 14.50 ± 5.94 and 14.48 ± 4.00 for *sII* and *sIII* respectively for the TMPD/Ascorbate method) between the two methods at 24 °C when using the same protein concentration of homogenates or isolations, which allowed us to validate our protocol ($n = 5$ in duplicate for both methods, Fig. 2.1A, B).

Table 2.1 Values of inhibition constant (K_i) of sodium azide calculated from transformed data using the Dickson linearization and values of metabolic flux control (C_i) calculated according to the following formula: $C_i = -(dJ/J)/(dl/K_i)$ where J is the respiration flux, dJ is the decrement of respiration flux caused by increment of inhibitor addition dl (between 0 and 80 μM) in the *sII* and *sIII* mitotypes at the four different temperatures. Results are means \pm s.d. ($n = 10$).

Temperatures	<i>sII</i>		<i>sIII</i>	
	K_i	C_i	K_i	C_i
12 °C	26.3 \pm 15.1	0.12 \pm 0.07	18.8 \pm 9.0	0.09 \pm 0.04
18 °C	35.7 \pm 13.2	0.32 \pm 0.12	41.1 \pm 10.0	0.31 \pm 0.08
24 °C	60.5 \pm 10.8	0.52 \pm 0.09	59.3 \pm 10.0	0.51 \pm 0.08
24 °C (TMPD+Asc)	66.4 \pm 16.1	0.57 \pm 0.14	60.1 \pm 16.2	0.52 \pm 0.14
28 °C	93.8 \pm 3.5	0.60 \pm 0.02	97.9 \pm 9.7	0.66 \pm 0.07

We chose the first method because there were no differences between mitotypes in the weights of flies, it did not need any mitochondrial isolation, and it required a lower number of flies and allowed us to freeze the remaining flies. There were no significant differences between the two methods, and consequently we can consider that the membrane solubilisation using Triton X-100 for homogenates preparations was not different from using TMPD. COX activity was measured for the four temperatures and expressed as nmol O_2 consumed per minute per mg protein.

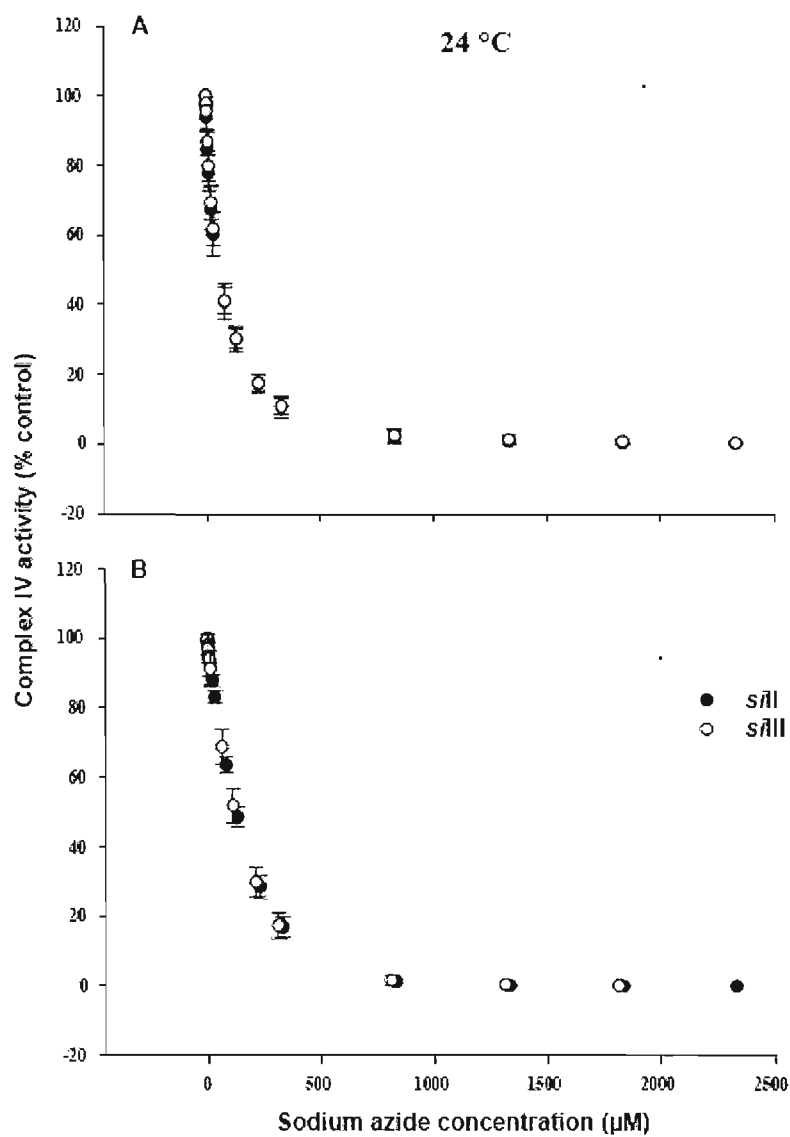


Figure 2.1 Sodium azide inhibition of cytochrome *c* oxidase activity at 24 °C using (A) the detergent-solubilized cytochrome *c* oxidase (COX) method performed on homogenates from whole flies or (B) the TMPD-Ascorbate method performed on mitochondrial isolations from thoraxes. Results are means \pm s.d. for five mitochondrial preparations or crude homogenates.

2.3.5.4 Catalase

After homogenates were centrifuged at 13 000 g for 3 minutes at 4 °C, the supernatant was incubated with 100 mM of sodium phosphate and 60 mM of H₂O₂. Decrease in absorbance, corresponding to the decomposition rate of H₂O₂, was measured at the four temperatures and at a wavelength of 240 nm for 1 minute ($\epsilon_{240} = 43.6 \text{ ml.cm}^{-1}.\mu\text{mol}^{-1}$) (Orr and Sohal., 1992).

2.3.5.5 Malondialdehyde

Malondialdehyde (MDA), the product of the peroxidation of fatty acids, was measured with a TBARS assay kit from Zeptometrix (Buffalo, NY, USA). This method relies on the fluorometric measurement of pink chromophor produced during the reaction of thiobarbituric acid with MDA. MDA contents were measured with light excitation set at 530 nm, emission set at 550 nm and width of 5 nm, and estimated following the manufacturer's protocol.

2.3.5.6 Protein content

Total protein content was determined both for mitochondria and homogenates in duplicate by the bicinchoninic acid method (Smith et al., 1985). As isolation buffer contained BSA, the protein due to the buffer was subtracted from the mitochondrial preparations.

2.3.6. Temperature coefficient values (Q10)

Q10 values for mitochondrial functions (State 3 and State 4 for both complexes I and III, COX activity, and ACO.CS⁻¹ ratios) were calculated using the following formula:

$$Q10 = (\text{Rate2}/\text{Rate1})^{10/(t2-t1)}$$

2.3.7. Chemicals

All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (Mississauga, Ontario, Canada) except for the TBARS determination assay kit from Zeptometrix (Buffalo, NY, USA).

2.3.8. Construction of biochemical threshold plots

An azide titration experiment of elevated pathway flux (with pyruvate, L-proline, malate, *sn* glycerol-3-phosphate and ADP), as well as azide titration experiment of COX activity allowed us to construct plots of relative respiration rate against the percentage of inhibition of COX activity at the same azide concentration (Letellier et al., 1994; Villani and Attardi, 1997). Measurements were done at the four temperatures and COX excess capacity was determined for each temperature as previously described.

2.3.9. Statistical analyses

All statistical analyses were performed with SAS software (9.1.3). O'Brien's tests for homogeneity and analysis of variance (ANOVA) with three independent variables (incubator, temperature and mitotype) were performed using a GLM procedure with the least square means method for multiple comparisons tests. This allowed us to determine any interactions between the variables, and the effect of each variable on the different parameters measured. Significance was defined at $P < 0.05$. Data are expressed as means of five different samples from each incubator, at each temperature, and for each mitotype measured in duplicate.

2.4 Results

No differences between incubators were detected for all the parameters measured, consequently data from incubators A and B were pooled.

2.4.1 Mitochondrial respiration

2.4.1.1 State 3m

For both complexes, state 3m exhibited the same pattern between the mitotypes for 12, 18 and 24 °C (Fig. 2.2A, B) as well as among the temperatures for the two mitotypes. There were significant differences between the two mitotypes at 18 °C ($P = 0.0168$ for pyruvate+malate+proline and $P < 0.0001$ for *sn* glycerol-3-phosphate), *sII* being higher than *sIII*.

sII showed a slight increase from 12 to 24 °C, with significant differences between 12 and 18 °C (P 's ≤ 0.0201 for both complexes), and between 18 and 24 °C ($P < 0.0001$ for both complexes). We detected a significant decrease when comparing 28 °C to 24 °C ($P < 0.0001$ for both mitotypes). The state 3m of complex III markedly increased from 18 to 24 °C ($P < 0.0001$) while staying similar at 24 and 28 °C (*sII*), or slightly increasing for *sIII* ($P = 0.0426$).

2.4.1.2 State 4o

sII had a significantly higher state 4o than *sIII* at 18 °C ($P \leq 0.0021$ for both complexes) and 24 °C (P 's ≤ 0.0123 for both complexes), while at 12 and 28 °C, it was significantly higher for *sIII* (P 's ≤ 0.0497) but only when substrates are provided to complex I (Fig. 2.2C, D).

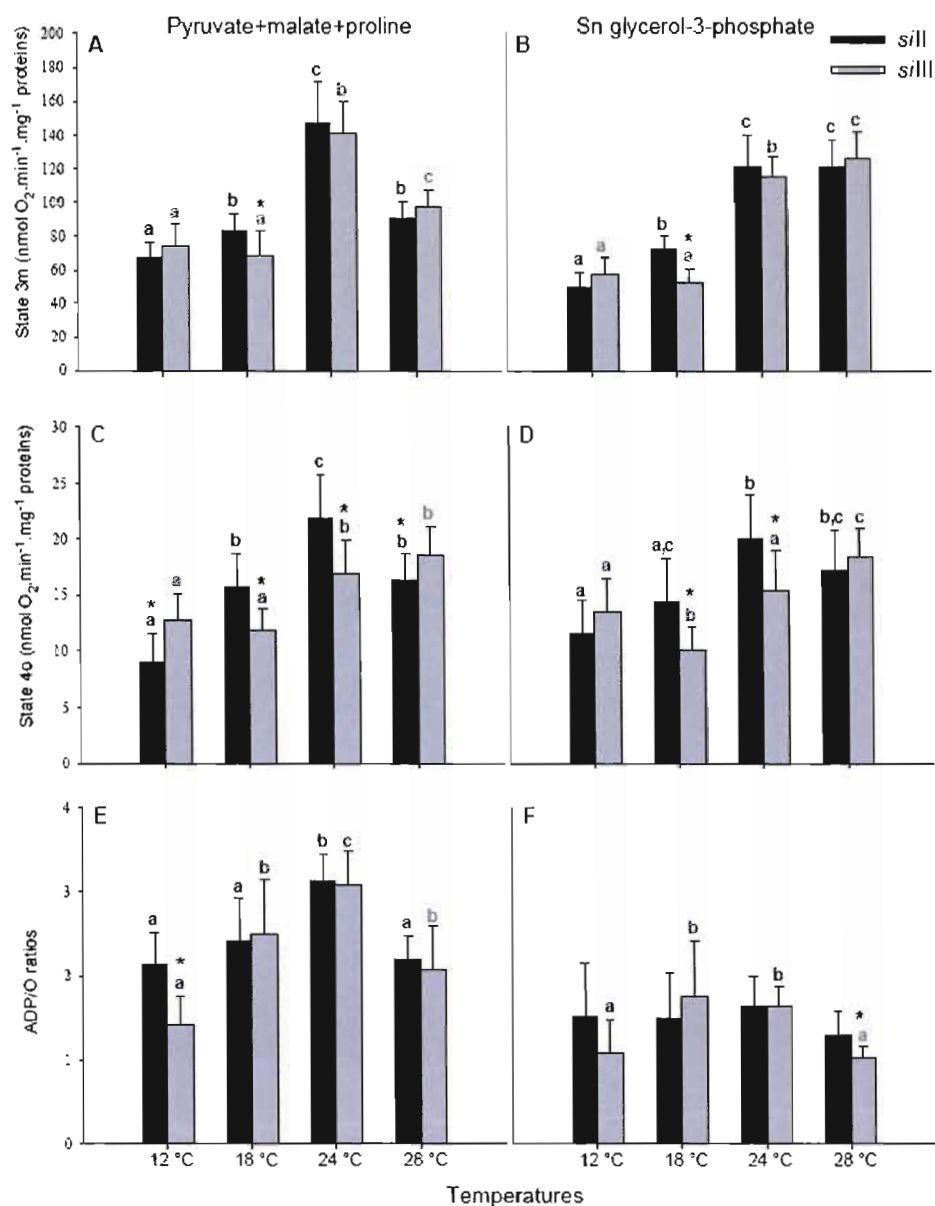


Figure 2.2 Mitochondrial functions measured at four different temperatures in isolated mitochondria from the two mitotypes of *Drosophila simulans* *sII* and *sIII*. State 3 respiration with (A) complex I substrates (pyruvate+malate+proline) and (B) *sn* glycerol-3-phosphate; State 4 respiration with inhibitor oligomycin at level of (C) complex I and (D) complex III; ADP/O ratios calculated from (E) complex I and (F) complex III. Results are means \pm s.d. for 10 mitochondrial preparations. Significance was set as $P < 0.05$; * denotes differences between mitotypes; letters denote differences between temperatures with a statistically different from b and c, b statistically different from c.

We also observed significant differences between 12 and 18 °C (complex I, $P < 0.0001$), 12 and 24 °C ($P < 0.0001$ for both complexes) and between 18 and 24 °C (P 's ≤ 0.0011 for both complexes) in *sII*. At 28 °C, a significant decrease was observed comparatively to 24 °C for complex I in *sII* ($P = 0.0002$).

In *sIII* state 4o of complex I significantly increased from 12 to 28 °C while in complex III it decreased between 12 and 18 °C ($P = 0.0106$) and increased between 18, 24 and 28 °C (Fig. 2.2C, D).

2.4.1.3 ADP/O ratios

When using substrates for complex I (Fig. 2.2E), there was a statistical difference between the two lines at 12 °C, with a higher ADP/O ratio for the *sII* mitotype ($P = 0.0003$). Among the temperatures, *sII* and *sIII* exhibited significant differences, with a higher ADP/O ratio at 24 °C compared to 12, 18 and 28 °C (all P 's ≤ 0.0002).

For complex III (Fig. 2.2F), the only significant difference between mitotypes occurred at 28 °C, with *sIII* being lower ($P = 0.0093$). Among the temperatures, no significant differences were detected for *sII* while *sIII* exhibited significant increases at 18 and 24 °C compared to 12 °C (P 's ≤ 0.0054) and to 28 °C (P 's ≤ 0.0026).

2.4.1.4 Respiratory Control Ratios and Uncoupling Control Ratios

Results of RCRs are presented in Fig. 2.3. Comparisons between mitotypes showed that there were significantly higher RCRs for *sII* at 12 °C at the complex I level ($P = 0.0231$), as well as at 28 °C at the complex III level ($P = 0.0143$). Surprisingly, the RCR of *sII* was significantly lower than *sIII* at 24 °C ($P = 0.0292$) when the substrates were provided to complex I.

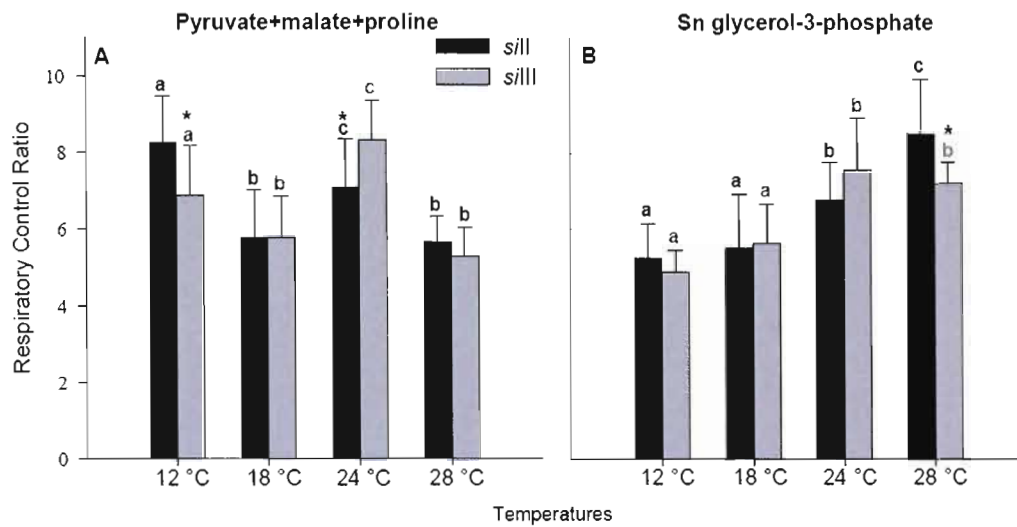


Figure 2.3 Effect of temperature on Respiratory Control Ratio (RCR) when mitochondrial preparations from the two mitotypes, *sII* and *sIII*, were supplied with pyruvate+malate+proline at the complex I level (A) or with *sn* glycerol-3-phosphate via glycerol-3-phosphate dehydrogenase to reduce complex III (B). Results are means \pm s.d. for 10 mitochondrial preparations. Significance was set as $P < 0.05$; * denotes differences between mitotypes; letters denote differences between temperatures with a statistically different from b and c, b statistically different from c.

In both mitotypes, RCRs of complex I were not different between 18 and 28 °C but both were significantly higher at 12 °C (P 's ≤ 0.0309 for both mitotypes) and 24 °C (P 's ≤ 0.0139 for both mitotypes). Moreover, RCR at 12 °C was higher than at 24 °C for *sII* ($P = 0.0238$), while we observed the opposite trend for *sIII* ($P = 0.0043$). We observed slight, but significant increases from 12 to 28 °C at the complex III level. Results of UCRs are shown in Table 2.2. No significant differences were detected in UCRs between strains or between temperatures.

2.4.2 Enzymatic measurements

No significant differences were detected between mitotypes (Fig. 2.4A) in ACO activity at any temperature, suggesting no differences in the oxidative stress supported by each of these lines, at least in mitochondria. This is reflected by

absences of significant differences between both mitotypes in MDA levels (data not shown).

COX activity was significantly higher for *sIII* only at 12 °C ($P < 0.0001$; Fig. 2.4B). Moreover, we observed a slight increase from 12 to 28 °C for both mitotypes with significant differences between 12, 18, 24 and 28 °C.

At 18 °C CAT activity was higher in *sII* compared to *sIII* ($P = 0.0116$) whereas at 28 °C it was lower ($P = 0.0005$) (Fig. 2.4C).

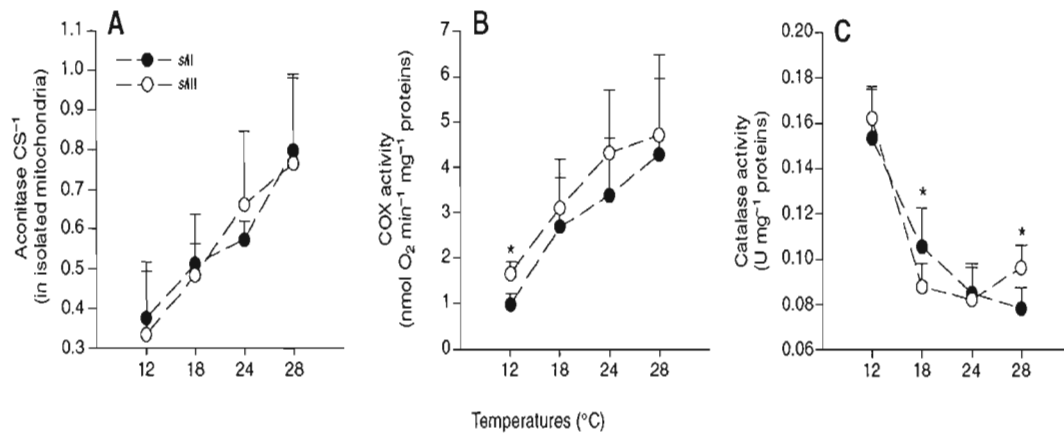


Figure 2.4 Thermal sensitivity of different key enzymes of mitochondrial metabolism and the antioxidant system from the two mitotypes, *sII* and *sIII*. (A) Ratios of aconitase activity over citrate synthase activity calculated from measures in isolated mitochondria from the two mitotypes, *sII* and *sIII*; (B) cytochrome c oxidase activity and (C) catalase activity measured in crude homogenates from the two mitotypes, *sII* and *sIII*. Results are means \pm s.d. for 10 mitochondrial preparations or crude homogenates. Significance was set as $P < 0.05$; * denotes differences between mitotypes.

2.4.3 COX excess capacity and flux metabolic control

Complex IV activity and mitochondrial respiration with pyruvate, malate, L-proline and *sn* glycerol-3-phosphate were inhibited by sodium azide. We examined the apparent excess capacity of COX at high flux through the ETS using a combination of substrates that maximally reduce complexes I and III. Azide titration resulted in hyperbolic inhibition of COX. The threshold plots display pathway flux as a function of COX activity; the threshold for inhibition of COX is defined as the intercept of the initial slope with the linear fit of the final slope (Fig. 2.5). The apparent excess capacity of COX is the intercept of the extrapolation of the linear regression for the final slope with the axis at zero COX inhibition. We detected a threshold, and consequently, a COX excess capacity at 12 °C with no distinctions between the two mitotypes (604%, $r^2 = 0.9139$ for *sII* and 613%, $r^2 = 0.9301$ for *sIII*).

Surprisingly, with increasing temperatures the COX excess capacity vanished and comparisons were made between the different K_i and C_i . We observed increasing K_i with increasing temperatures but no differences between mitotypes were detected (Table 2.1).

For C_i comparisons, there were no significant differences between mitotypes but significant increases were detected from 12 °C to 28 °C (Table 2.1). All temperature comparisons were significantly different (all P 's ≤ 0.0005).

Q10 values for $ACO.CS^{-1}$ and state 3m are presented in Table 2.3.

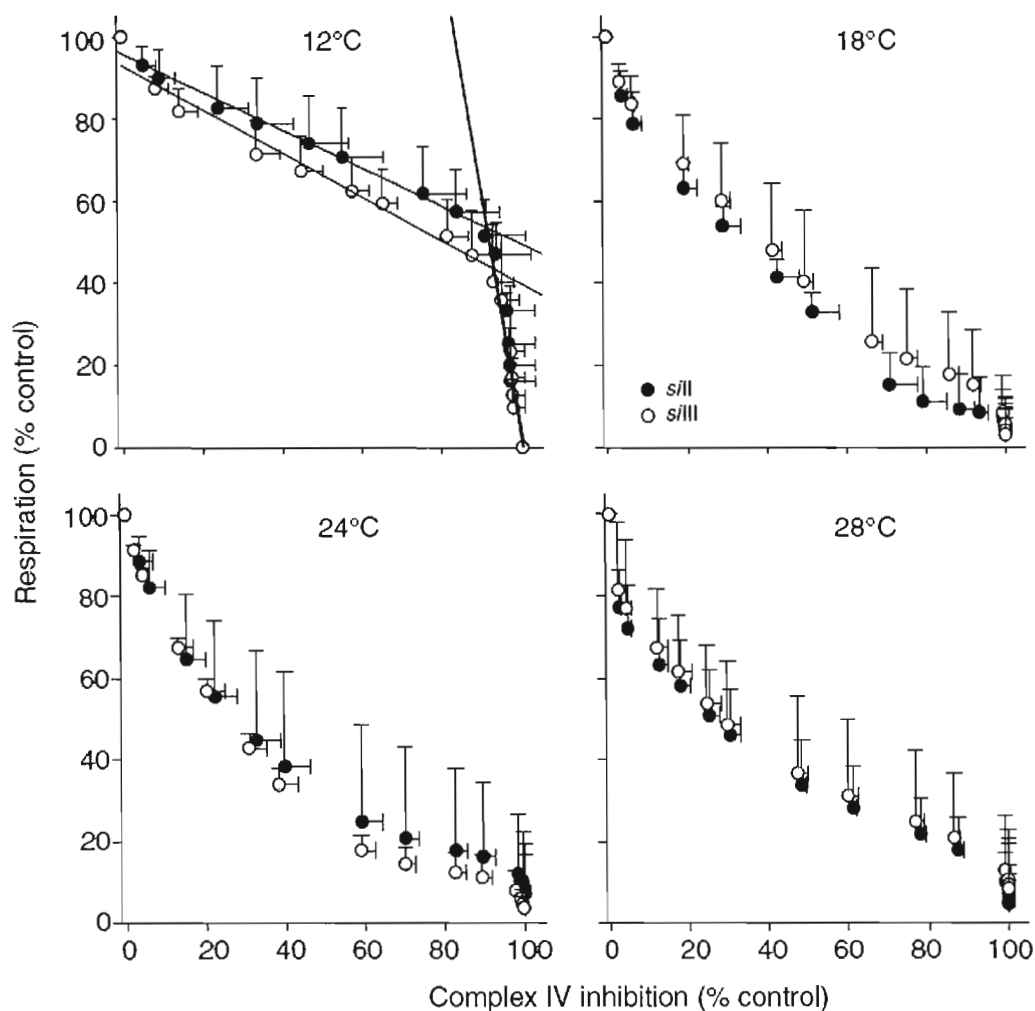


Figure 2.5 Complex IV thresholds measured at four different temperatures in the two mitotypes studied, *s/II* and *s/III*. Respiration was measured in isolated mitochondria fed with pyruvate+proline+malate+*sn* glycerol-3-phosphate as substrates followed by an azide titration of flux through the respiratory system. Complex IV inhibition was measured in crude homogenates following azide titration of the enzyme velocity using the same azide titration steps as for the respiratory system. The COX excess capacity is represented by the threshold plot, which shows the relative flux through the ETS as a function of relative inhibition of COX at similar azide concentrations. At 12 °C, two linear regressions were calculated from initial and final slopes, and extrapolated to zero COX inhibition (*s/II*, $r^2 \geq 0.9840$ and $r^2 \geq 0.9139$ respectively; *s/III*, $r^2 \geq 0.9651$ and $r^2 \geq 0.9301$, respectively). The intercepts are the COX excess capacity (see text below). Results are means \pm s.d. ($n = 10$).

Table 2.2 Values of Uncoupled control ratios (UCRs) measured in mitochondrial isolations. UCRs were calculated as state U/state 3m with state U representing the maximum uncoupled respiration rate (reached between 0.2 and 0.5 μM of FCCP) and state 3m representing the maximum active state 3 achieved with injection of 400 μM of ADP. Results are means \pm s.d. for 10 mitochondrial preparations.

Temperatures	Uncoupled Control Ratios (UCRs)			
	<i>sII</i>		<i>sIII</i>	
	Pyruvate		Pyruvate	
	+Malate	<i>Sn</i>	+Malate	<i>Sn</i>
	+Proline	glycerol-3-phosphate	+Proline	glycerol-3-phosphate
12 °C	0.98 \pm 0.08	0.99 \pm 0.07	0.99 \pm 0.06	1.00 \pm 0.06
18 °C	0.98 \pm 0.03	0.98 \pm 0.078	0.95 \pm 0.06	0.95 \pm 0.05
24 °C	0.99 \pm 0.07	0.96 \pm 0.05	0.98 \pm 0.05	0.95 \pm 0.05
28 °C	0.94 \pm 0.60	0.96 \pm 0.04	0.99 \pm 0.10	0.98 \pm 0.04

Table 2.3 Temperature coefficients (Q10) for ACO.CS⁻¹ ratios and for mitochondrial respiratory fluxes in state 3m. Q10 values for mitochondrial functions were calculated according to the following formula: $Q10 = (Rate2/Rate1)^{10/(t2-t1)}$. Results are means of 10 mitochondrial preparations. Significance was set as $P < 0.05$; * denotes differences between mitotypes.

	Temperature coefficients (Q10)					
	12 to 18 °C		18 to 24 °C		24 to 28 °C	
	<i>sill</i>	<i>silll</i>	<i>sill</i>	<i>silll</i>	<i>sill</i>	<i>silll</i>
ACO.CS ⁻¹	1.68	1.85	1.21	1.68	2.29	1.44
State 3m						
Pyruvate+malate+proline	1.58	0.95*	2.68	3.40	0.35	0.43
Sn glycerol-3-phosphate	2.03	0.92*	2.37	3.74*	1.17	1.31

* represents differences between strains with $P < 0.05$

2.5 Discussion

Comprehension of the physiological and biochemical bases of temperature sensitivity of mitochondrial function appears essential to determine the capacity of organisms to cope with changing environmental conditions, and constraints they may face under these conditions. In our study, we compared two mitotypes of *D. simulans* in order to (1) evaluate the plasticity of different enzymes of the ETS and (2) to link mtDNA divergences with mitochondrial bioenergetics at several steps of the ETS. To our knowledge, this study is the first to deal with impact of temperature variations on mitochondrial functions in different mitotypes of the same species.

The two Krebs' cycle enzymes that are fully encoded by the nuclear genome, CS and ACO, showed no differences between mitotypes. This result suggests a weak impact of the nuclear genes on divergences of mitochondrial functions

between these two populations. ACO is an enzyme selectively carbonylated and functionally altered in the housefly mitochondrial matrix by reactive oxygen species (Yan et al., 1997; Yan and Sohal, 1998; Yarian and Sohal, 2005), and can be used as a proxy of the steady state concentration of superoxide in the matrix (Gardner, 2002; Miwa and Brand, 2005). CAT activity of *sII* mitotype was higher at 18 °C than *sIII*. The latter mitotype showed more elevated CAT activity at 28 °C. As MDA levels and ACO activities remain constant between mitotypes at all temperatures, we suggest that these different CAT thermal sensitivities may result from expression of different allozymes in both populations, and consequently of different antioxidant activity.

The maximal rates of mitochondrial respiration were reached at 24 °C for both mitotypes and when mitochondria were provided via glycerophosphate dehydrogenase to reduce complex III these rates were similar to those found at 25 °C by Katewa and Ballard (2007). However, when mitochondria received electrons by pyruvate+malate+proline to reduce the complex I, we obtained higher respiration rates than these authors, which are likely due to addition of malate as substrate in the present study. Katewa and Ballard (2007) found significant differences between mitotypes at 25 °C, whereas we did not detect any differences between mitotypes except at 18 °C where *sII* showed higher catalytic capacity. Interestingly, this higher capacity came with higher CAT activity. Maximal state 3m with pyruvate+malate+proline was found at 24 °C whereas with *sn* glycerol-3-phosphate it was at 24 and 28 °C.

The decrease of catalytic capacities of mitochondrial state 3m respiration between 24 and 28 °C (Table 2.3) follow the same pattern as in other ectothermic species as reported in rainbow trout red muscle (Blier and Guderley, 1993a; Guderley et al., 1997) and in Arctic char (Blier and Lemieux, 2001), which show a decrease at high temperature. There is however no decrease in the catalytic capacities when electrons are supplied to the ubiquinone pool via glycerophosphate dehydrogenase (Table 2.3). This clearly suggests that the decline in respiration rates at higher temperature when electrons are supplied at the level of complex I is

induced by decreasing activities of enzymes upstream complex III.

Interestingly, state 4o follows the same pattern as state 3m with more pronounced differences between mitotypes (for all temperatures using complex I substrates, and for 18 and 24 °C using *sn* glycerol-3-phosphate). At 18 and 24 °C, *sII* exhibits a higher state4o than *sIII* for both complexes, whereas at extreme temperatures (12 and 28 °C) the higher state 4o is measured in *sIII* but only with complex I substrates and this difference is not maintained for *sn* glycerol-3-phosphate. During state 4, $O_2^{\cdot -}$ and H_2O_2 production are believed to be the highest (Forman and Boveris, 1982). Our results on state 4o are consistent with a previous study by Katewa and Ballard (2007), which showed higher H_2O_2 production in *sII* at 25 °C. Our results could also suggest that flies with *sII* mtDNA are better adapted to a large temperature range and specifically to extreme temperatures, whereas *sIII* has a smaller thermal range. This would be in line with the lower impact of lower temperature on ADP/O ratio as well as with the geographical distribution of both mitotypes. Flies from the two mitotypes were collected in Kenya where they live in sympatry; however *sII* has a worldwide distribution whereas *sIII* is endemic to continental east Africa, Madagascar and Reunion Island. This spatial niche differentiation hypothesis does not however exclude the possible temporal niche differentiation (diurnal or seasonal differences in haplotype performance/abundance). Obviously, at this stage of experimentation we cannot determine if the differences in mtDNA per se have any adaptive significance. Indeed, while there are isolated temperature-specific differences between mitotypes, these differences are not consistent across the various functional attributes measured. Consequently, there is little support for a conclusion that one mitotype has a broader temperature range for mitochondrial performance than the other.

The ratio of OXPHOS capacity to leak respiration is used as a coupling index of isolated mitochondria and of the functional integrity of mitochondria (RCR; Chance and Williams, 1956). RCRs obtained using substrates for complex I and the substrate *sn* glycerol-3-phosphate indicate a well-coupled respiration. *sII* showed more coupled respiration, as well as a higher ADP/O ratio at 12 °C when

mitochondria were supplied in electrons at complex I level. This result shows that *sII* exhibits a higher efficiency of substrate oxidation and OXPHOS capacity at 12 °C. Moreover, low RCRs at 18 °C (5.78 ± 1.2 for *sII* and 5.79 ± 1.1 for *sIII*) and 28 °C (5.67 ± 0.7 for *sII* and 5.27 ± 0.8 for *sIII*) suggest that the mixture pyruvate+malate+proline is associated with a lower efficiency of OXPHOS at these temperatures, which is supported by ADP/O ratios calculated at the same temperature. The ADP/O ratios for complex I also show optimal temperature at 24 °C. The decrease in ADP/O ratios are likely induced by higher thermal sensitivity (and decrease) in state 3m respiration compared to state 4o as illustrated by RCRs. Surprisingly, high RCR values for both mitotypes at 12 °C do not correspond to high ADP/O ratios, even if differences in RCRs between mitotypes were paralleled by differences in ADP/O ratios for this temperature. This result can only be explained by loss of OXPHOS capacity during state 3m at low temperature.

When mitochondria received electrons from the glycerophosphate dehydrogenase (at the level of complex III), we observe a slight increase of RCRs from 12 to 28 °C. The only difference between mitotypes for this complex occurs at 28 °C where, once again, *sII* exhibits higher RCR. At all temperatures, RCRs as well as ADP/O ratios are more elevated in complex I, showing higher OXPHOS capacity with pyruvate+malate+proline induced by activation of complex I proton pump. The only exception is at 28 °C, where the higher RCR with *sn* glycerol-3-phosphate reflects a lower thermal sensitivity of state 3 respiration when ETS is supplied with *sn* glycerol-3-phosphate. However, at this temperature, we do not observe a concomitant increase in the ADP/O ratios, which suggest that OXPHOS capacity is partly dissipated downstream of the ETS during state 3m respiration (at complex IV, or by higher rate of proton leakage). When comparing state 3m respiration of mitochondria supplied either with pyruvate+malate+proline or *sn* glycerol-3-phosphate, the state 3m is higher with electrons provided to complex I, illustrating that complex IV (cytochrome *c* oxidase) can support much higher rate of oxidation than the one provided when supplying electrons only via glycerol-3-phosphate dehydrogenase to reduce complex III (*sn* glycerol-3-phosphate), at least

at three temperatures we tested. The important decrease of complex I state 3m respiration between 24 and 28 °C, despite the absence of thermal sensitivity of complex III state 3m respiration at these same temperatures, suggests that the likely limitation of respiration comes upstream of complex III. This is also supported by the low UCR values (below but not significantly different from 1.0, Table 2.2) at any temperature, suggesting that ATP synthesis capacity (ATP synthase) can support the maximum respiration rates.

For COX activity, an increase from 12 to 28 °C was observed, as seen in other ectothermic species (Blier and Lemieux, 2001; Lemieux et al., personal communication). We did not detect a loss of activity between 24 and 28 °C ($Q_{10_{24-28}} = 1.81$ for *sII* and $Q_{10_{24-28}} = 2.66$ for *sIII*). This result suggests that COX is likely not responsible for the reduction of catalytic capacities at 28 °C when mitochondria are supplied in electrons at the complex I level. The decrease of the catalytic capacities of complex I observed at 28 °C is therefore likely due to upstream ETS (complex I, II or III) or dehydrogenases, which drive the entry of the substrates in the ETS.

COX excess capacity was measured at high pathway flux with both complexes fully fuelled in electrons (pyruvate+malate+proline+glycerol-3-phosphate). An important excess was observed only at 12 °C, with an excess of about 604% for *sII* and 613% for *sIII*. At this temperature, the COX maximal activity should reach a significantly higher level of inhibition before impairment of mitochondrial respiration (approximately 91.7% for *sII* and 93.0% for *sIII*). Excess capacity of COX has been reported in ectotherms (Blier and Lemieux, 2001; Farge et al., 2003) as well as in endotherms (Rossignol et al., 1999). At 12 °C, COX catalytic capacities do not exert a strong control over the OXPHOS capacity ($C_i = 0.12 \pm 0.07$ for *sII* and $C_i = 0.09 \pm 0.04$ for *sIII*). From 18 to 28 °C, no excess capacity of COX was detected and C_i increased slightly along with temperature, suggesting important control of OXPHOS capacity by COX. This result also suggests that maximal, uninhibited COX activity could not support higher respiration rates than the maximal rate experimentally measured in the present study, where we used excess concentrations of different substrates. These results may indicate that when the ETS is “nearly saturated” with

electrons from carbon substrates, the system is close to its limit and therefore complex IV does not present any excess. Other studies have found high threshold values for the complex IV in *Drosophila* (Farge et al., 2003), as well as in rat mitochondria (Letellier et al., 1994; Rossignol et al., 1999) but only when the complex I was reduced using glutamate+malate or pyruvate+malate. Particularly, Farge et al. (2003) found the same type of threshold curve for *Drosophila subobscura* at 28 °C with glutamate+malate that we did at 12 °C with pyruvate+malate+proline+glycerol-3-phosphate. This result suggests that at 12 °C, when all substrates were used, there is impairment of electron entry into the ETS, and likely at the level of upstream dehydrogenases.

This highlights the fact that the mitochondrial metabolic enzymes have different thermal sensitivities and that temperature changes should necessarily modify the proportions of catalytic capacities of the different enzymes and therefore, the regulation of the whole pathway. At low temperatures (12 °C in our study) regulation at the level of COX was relaxed, likely due to much higher thermal sensitivity of other mitochondrial enzymes or processes. From 18 to 28 °C, which covers the optimal temperature conditions, mitochondria are more regulated by COX.

In summary, we have shown that differences between the two mitotypes are observed at low temperature (12 °C) where *sII* display higher RCR and ADP/O ratio than *sIII* as well as lower state 4_o. To investigate the significance of state 4_o, the experiment must be repeated with an assessment of membrane potential, because proton leak can only be estimated from state 4_o when membrane potential is known or controlled. At this stage, we cannot however conclude about the adaptive value of mtDNA partly because the temperature-specific differences detected are not consistent across the various functional parameters measured and they cannot be linked yet to any fitness divergences at the specific ecological niches of the two populations. We have also shown that different ETS enzymes have different thermal sensitivities which can lead to different distribution of control along the ETS and dehydrogenases process at different temperatures leading to quite low level of respiration control by COX at low temperature. However, important properties of

mitochondria may differ *in vivo* and *in vitro* (Kuznetsov et al., 2008). Further *in situ* studies (on permeabilized fibers) among mitotypes of *Drosophila simulans* should reveal characterization of functional mitochondria in their normal intracellular position and assembly, conserving interactions with other organelles. Moreover, introgressions between mitotypes should highlight the adaptive value of *Drosophila* mitochondria in coadapted cellular environments.

2.6 Acknowledgements

Many thanks are due to H. Lemieux, S. Breton and R. Vergilino for their help with experimental protocols. This study was supported by research grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) to P.U. Blier.

CHAPITRE III

THERMAL SENSITIVITY OF MITOCHONDRIAL FUNCTIONS IN PERMEABILIZED MUSCLE FIBERS FROM TWO POPULATIONS OF *DROSOPHILA SIMULANS* WITH DIVERGENT MITOTYPES

Nicolas Pichaud¹, J William O Ballard², Robert M Tanguay³, and Pierre U Blier¹.

¹ Laboratoire de biologie intégrative, Département de Biologie, Chimie, Géographie Université du Québec à Rimouski, 300 Allée des Ursulines, Rimouski, Québec, Canada G5L 3A1 (N. Pichaud : conception du projet, expérimentation, analyse des données, rédaction de l'article et conception des figures; P.U. Blier : aide à la rédaction).

² School of Biotechnology and Biomolecular Sciences, University of New South Wales, Sydney 2052, Australia (J.W.O. Ballard: aide à la redaction).

³ Laboratoire de Génétique Cellulaire et développementale, Département de Biologie Moléculaire, Biochimie Médicale et Pathologie, Institut de Biologie intégrative et des systèmes, 1030 ave de la Médecine, Université Laval, Québec, Canada G1V 0A6 (R.M. Tanguay : aide à la rédaction).

Accepté dans *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. Les références citées dans l'article sont reportées à la fin de la thèse.

3.0 Résumé

L'objectif de cette étude était d'identifier les différences au niveau des performances mitochondriales et de la thermosensibilité associées à des populations possédant différents haplotypes mitochondriaux et différentes distributions géographiques. Pour cela, la respirométrie à haute résolution a été utilisée sur des fibres perméabilisées de muscles thoraciques prélevées sur *Drosophila simulans*. Nous avons mesuré l'impact de la température sur la respiration mitochondriale de deux mitotypes (*s11* et *s111*) de *D. simulans* en utilisant des titrations expérimentales (différentes combinaisons de substrats, de découpleurs et d'inhibiteurs) afin d'examiner les conséquences fonctionnelles des voies métaboliques mitochondriales convergeant à la jonction Q du système de transport des électrons (ETS) à quatre températures différentes. Nous avons aussi mesuré l'intégrité fonctionnelle de la membrane externe, l'activité de la pyruvate déshydrogénase (PDH), la respiration découplée ainsi que l'excès apparent de cytochrome *c* oxydase (COX) aux mêmes températures lors d'un flux élevé d'électrons dans l'ETS. Des différences entre mitotypes ont été détectées à 24°C et ces différences ont été proposées comme étant dues à l'efficacité des complexes en aval (complexes III ou IV) à réduire le flux d'électrons. L'excès apparent de COX détecté à 12°C est sûrement connecté aux déshydrogénases car ce sont elles qui gèrent le flux d'électrons dans l'ETS. De plus, les résultats sur la sensibilité thermique ont montré que la température affecte les capacités catalytiques des différentes enzymes de l'ETS. Cependant, nous n'avons pas pu confirmer que la différence au niveau de la capacité à ravitailler l'ETS en électrons provient des divergences au niveau de l'ADN mitochondrial (ADNmt) puisque celles-ci peuvent aussi provenir des interactions entre protéines codées par le génome nucléaire et par le génome mitochondrial.

3.1 Abstract

The aim of this study was to use high-resolution respirometry with permeabilized fibers of thorax muscles of *Drosophila simulans* to identify differences in mitochondrial performance and thermal sensitivity associated with populations possessing different mitochondrial haplotypes and geographical distributions and to determine if there were some differences using mitochondrial isolations for the same purpose. We measured the impact of temperature on mitochondrial respiration in two mitotypes (*sII* and *sIII*) of *D. simulans* using multiple substrate-uncoupler-inhibitor titration experiments to investigate the functional consequences of convergent mitochondrial pathways at the Q-junction of the electron transport system (ETS) from three different branches at four different temperatures. We also measured the functional integrity of outer mitochondrial membrane, the pyruvate dehydrogenase (PDH) activity, the uncoupled respiration as well as the excess capacity of complex IV (COX) at the same temperatures during high convergent pathway flux. Differences between mitotypes were detected at 24°C and these differences were proposed to be driven by efficiency of downstream complexes (either complex III or IV) to deplete electrons. The apparent COX excess capacity detected at 12°C may be related to dehydrogenases process since they drive the electron input into the ETS. Moreover, results on thermal sensitivity showed that temperature affects the catalytic capacity of the different enzymes of the ETS. However, we cannot confirm yet that the difference in the capacity to fuel the ETS in electrons comes from the divergences in the mitochondrial DNA (mtDNA), it may be related to nuclear-encoded and mitochondrial-encoded protein interactions.

3.2 Introduction

The complexes of the mitochondrial electron transport system (ETS) are encoded by both nuclear and mitochondrial DNA (mtDNA) and are suspected to partly evolve to adjust oxidative phosphorylation (OXPHOS) to environmental conditions of the organism (Das, 2006). MtDNA codes for 13 peptides involved in oxidative phosphorylation. Since all mtDNA genes are usually transmitted maternally (but see Breton et al., 2007) as one single haplotype, it has been suggested that selection on mtDNA might lead to haplotypes adapted to different environments (Blier et al., 2001; Fontanillas et al., 2005).

We tried here to identify differences in mitochondrial performance and thermal sensitivity associated with mtDNA haplotype divergences in the fly *Drosophila simulans*. This question was already addressed in a previous paper (Pichaud et al., 2010) and we concluded that the catalytic capacities of the different enzymes of the ETS have different thermal sensitivities and the corresponding involvement of the different steps of the ETS on mitochondrial regulation likely varies with temperature-induced changes. However, we were not able to conclude about the adaptive value of mtDNA partly because the temperature-specific differences detected were not consistent across the various functional parameters measured. To our knowledge, most studies on the thermal sensitivity of the mitochondrial respiration, including ours, have been done on isolated mitochondria (Blier and Guderley, 1993a; Blier and Guderley, 1993b; Hardewig et al., 1999; Blier and Lemieux, 2001; Abele et al., 2002; Chamberlin, 2004; Fangue et al., 2009; Ulrich and Marsh, 2009; Lemieux et al., 2010; Pichaud et al., 2010). Although valuable for assessing mitochondrial functional integrity, maximal capacity of oxidative phosphorylation (which was highlighted in our previous study) and import of mitochondrial proteins, Kuznetsov et al. (2008) emphasized that properties of mitochondria differ *in vivo* and *in vitro*. It is therefore difficult to evaluate the impact of environmental conditions when the *in vitro* environment does not reflect the physiological conditions. Studying functional mitochondria *in situ* in permeabilized muscle fibers allows a physiologically relevant assessment of mitochondria within an integrated cellular system, in their normal

intracellular position and assembly, preserving essential interactions with the cytoskeleton, nucleus and endoplasmic reticulum (Rizzuto et al., 1998; Saks et al., 1998; Milner et al., 2000; Dzeja et al., 2002; Csordás et al., 2006; Kuznetsov et al., 2008). While this approach has been widely used to detect mitochondrial cytopathies in mammals (including humans), it has not been used so far to address the impact of environmental conditions (especially temperature) in ectothermic species. We developed here a new method using this approach to re-investigate the potential adaptive values of genetic traits in terms of mitochondrial functions and to determine whether the lack of differences found in our previous experiment using isolated mitochondria (Pichaud et al., 2010) were also seen using the *in situ* approach. This accurate method may highlight if these traits translate to subtle modification of the regulation or the catalytic capacity of the oxidative phosphorylation process at the various steps of the ETS in a more relevant manner than our previous study.

Drosophila, a complex of ectothermic and eurythermic species, is an appropriate model to study the adaptive value of mtDNA since these species are easy to breed, their genome has been extensively studied, and can be genetically manipulated.

Particularly, *Drosophila simulans* harbours three geographically distinct, subdivided haplogroups (*sI*, *sII*, *sIII*) with nearly 3% interhaplogroup divergence (Ballard, 2000a; Ballard, 2004; Ballard, 2005) but lacks any nuclear subdivision at any nuclear encoded loci tested to date (Katewa and Ballard, 2007; Melvin et al., 2008). The *sII* and *sIII* mitotypes live in sympatry in Kenya where the frequency of the *sIII* type is about 40% (Ballard, 2004). In four wild caught *sII* and four *sIII* fly lines, low amino acid variation was observed within mitotypes in a 4.5 kb region spanning from position 1450 to position 5983 of the mtDNA genome. In contrast large divergences were noticed between the mitotypes ($2.04 \times 10^{-2}\%$ nucleotide divergence, $1.21 \times 10^{-2}\%$ amino acid divergence in the same region) (Ballard et al., 2007). In this context, variations between mitotypes are highly suspected to affect the performances of mitochondria and the overall regulation of mitochondrial respiration through a different control of a particular enzyme of the ETS. To investigate the metabolic characters associated with a given mitochondrial

haplotype, the easiest way to proceed is to assess the mitochondrial respiration and the electron flux throughout the ETS in populations characterized by divergent haplotypes. Estimation of the thermal sensitivity of the ETS complexes may furthermore highlight functional divergences among mitochondria from these different populations. Temperature necessarily affects the catalytic capacities of the ETS complexes (but see Pörtner, 2002). For example, the cytochrome *c* oxidase (COX, complex IV) was generally found in excess in isolated mitochondria and this excess compared with the aerobic mitochondrial capacity seems to be a basis for the high oxygen affinity of the mitochondrial respiration (Gnaiger et al., 1998). Thermally induced-changes in COX activity would therefore have little effect on the maximal respiration rate while still acting on regulation of respiration mainly through impact upon the redox state of ETS (Blier and Lemieux, 2001). The apparent COX excess capacity depends on the reference state: when substrate supply is taken as the reference state with an artificially limited OXPHOS capacity, then the apparent COX excess capacity is increased (Gnaiger et al., 1998, Rossignol et al., 2003; Gnaiger, 2009). In the case of high electron input in the ETS using multiple substrates, our laboratory showed that the COX excess capacity was low, even non-existent, depending on the experimental temperature. As a consequence, the level of control of mitochondrial respiration by COX changes according to the temperatures tested (Pichaud et al., 2010). These differences in the apparent COX excess capacity were proposed to be associated to alteration of the distribution of control along the ETS and dehydrogenase processes with temperature changes. The control of OXPHOS and regulation of mitochondrial respiration is thought to be shared by different complexes: the phosphorylation system, ETS and the reactions that provide substrates and electron to the system, for example substrates transporters and dehydrogenases. Since all these processes are expected to be differently affected by temperature the distribution of control strength may also be altered by temperature. The selection pressure on ETS enzymes could be dictated by the environment, especially the thermal environment for ectotherms, and leading to changes in both nuclear-encoded and mitochondrial-encoded subunits of ETS complexes (Willett and Burton, 2004; Ellison and Burton, 2006), giving a specific

adaptive value to mitochondrial haplotypes in the management of the temperature impact on the electron flux. Moreover, Lemieux et al. (2010) reported that pyruvate dehydrogenase (PDH) may play a major role in the determination of thermal sensitivity of carbohydrate-supported OXPHOS in rat heart. Investigation of catalytic capacities of the different enzymes of the ETS as well as the activity of the PDH at different temperatures is therefore important to understand management of the control of mitochondrial respiration and plausibly adaptation to environmental temperature.

We therefore measured mitochondrial respiration at 12, 18, 24°C (considered as an optimal temperature) and 28°C in permeabilized fibers during high electron input through the ETS using multiple substrate-uncoupler-inhibitor titration (SUIT) protocols (Gnaiger, 2007) adapted to *Drosophila* which allows scrutinizing on control of OXPHOS capacity, and exploring the functional consequences of convergent mitochondrial pathways at the Q-junction (Gnaiger, 2007). The thermal sensitivity of mitochondrial respiration was measured with different combinations substrates of complex I, complex II, complex III through Q pool, and their respective inhibitors. We also determined functional integrity of outer mitochondrial membrane, thermal sensitivity of uncoupled respiration as well as that of the excess capacity of COX at high convergent pathway flux using inhibitor titration experiments in order to compare overall mitochondrial performances at different temperatures of both mitotypes. Measurements of pyruvate dehydrogenase activity were also performed to investigate the electrons entry in the ETS at the level of complex I. Our results showed that differences were detected at 24°C between mitotypes (contrasting our previous study) principally when high electron flux converged at the Q-junction. Moreover, the thermal sensitivity was highly divergent between mitotypes at almost all steps of the ETS that we assessed, which might advantage one mitotype in colonizing spatial niches with wider temperature range.

3.3 Material and methods

3.3.1 Fly mitotypes

Drosophila simulans (STURTEVANT 1919), *sII* and *sIII* both collected in Kenya, were used for experiments. For each mitotypes, four isofemale lines (namely 2KY0412, 2KY0415, 2KY0418 and 2KY0421 for *sII*; 3KY0410, 3KY0412, 3KY0414 and 3KY0420 for *sIII*) were reared from flies collected in Nairobi (Kenya) during November 2004 (Ballard et al., 2007). The mtDNA haplotype was determined using allele-specific PCR as described previously for each isofemale line (Dean et al., 2003), and *Wolbachia* infection was tested using conserved 16S rDNA primers (30). According to Ballard et al. (2007), there is only one nonsynonymous change within *sII* lines and one nonsynonymous change within *sIII* lines over 5500 bp of mtDNA analysed. In contrast large divergences were noticed between the mitotypes ($2.04 \times 10^{-2}\%$ nucleotide divergence, $1.21 \times 10^{-2}\%$ amino acid divergence in the same region). PCR assays showed that all isofemale lines belonged to the corresponding mtDNA haplotype and were not infected by *Wolbachia*.

Flies were reared at constant temperature ($24.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$), humidity (50% RH), diurnal cycle (12 h:12 h light:dark) and density (approximately 100 flies for 25 ml of standard cornmeal medium) as described previously (Pichaud et al., 2010). Briefly, flies were reared in standard cornmeal medium containing a mixture of 10 g of agar-agar, 12 g of sugar, 54 g of dried yeast and 106 g of cornmeal flour dissolved in 2 l of tap water. Propionic acid (8 ml) and methyl-4-hydroxybenzoate 10% (w/v) in ethanol (32 ml) were added to the mixture to avoid mite and mould contamination. All *Drosophila* used for experiments were 10-days-old males (the large number of mitochondria in female abdominal oocytes may bias experimental measurements). To avoid fitness problems associated with aging the parents of the experimental flies were less than 14 days old. Each population was reared in two different incubators (A and B) to allow replicates of experimental lines and to avoid any “incubator” effect. Flies used for fiber permeabilization as well as for enzymatic analyses were

weighted individually with an electrobalance (Mettler-Toledo Inc., Columbus, OH, USA) with a resolution of 0.1 μg .

3.3.2 Preparation of permeabilized muscle fibers

All steps were done at 4°C. Flight muscles from 4 or 8 thoraxes (1 for 28°C or 2 for 12, 18 and 24°C from each isofemale line of the same mtDNA type) of 10-days-old *D. simulans* were taken for fiber permeabilization. Thoraxes were separated from abdomens and heads and then placed onto a Petri dish with 2 ml of relaxing solution (BIOPS; Veksler et al., 1987; Letellier et al., 1992) containing 2.77 mM CaK_2EGTA , 7.23 mM K_2EGTA , 5.77 mM Na_2ATP , 6.56 mM MgCl_2 , 20 mM Taurine, 15 mM $\text{Na}_2\text{Phosphocreatine}$, 20 mM Imidazole, 0.5 mM Dithithreitol, 50 mM K-MES, pH 7.1. Individual fiber bundles were separated with two pairs of sharp forceps, achieving thin muscle-fiber bundles. The fiber bundles were transferred to a Petri dish containing 2 ml of BIOPS and 81.25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ saponin and were gently mixed at 4°C for 30 minutes. Note that preliminary experiments optimizing the maximal Respiratory Control Ratio (RCR) at 24°C determined the saponin concentration ($n=3$ for each concentration: RCR = 3.3 for 23.75 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; RCR = 6.9 for 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; RCR = 7.5 for 81.25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; RCR = 6.2 for 110 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Fiber bundles were then rinsed at 4°C for 10 minutes in respiration medium containing 120 mM KCl, 5 mM KH_2PO_4 , 3 mM Hepes, 1 mM EGTA, 1 mM MgCl_2 and 0.2% bovine serum albumin (BSA) (w/v), pH 7.2 and immediately transferred into a respirometer (OXYGRAPH-2K, Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria) filled with air-saturated respiration medium. The oxygen electrodes were calibrated with air-saturated respiration medium at each experimental temperature, and zero oxygen measurements were taken after sodium dithionite addition. O_2 solubility for medium respiration was calculated for the four experimental temperatures according to Rasmussen and Rasmussen (2003).

3.3.3 High-resolution respirometry

3.3.3.1 O₂ fluxes measurements with substrates and uncoupler

Respiration was measured at 12, 18, 24°C (with permeabilized fibers from 8 thoraxes) and 28°C (with permeabilized fibers from 4 thoraxes) and data acquisition and analysis measured using the software DatLab (Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria). According to the temperature and the mitotype tested, mitochondrial respiration of 7 to 20 different preparations were averaged for each incubator (19 and 12 preparations for *sII* and *sIII* respectively at 12°C; 16 and 20 preparations for *sII* and *sIII* respectively at 18°C; 13 and 19 preparations for *sII* and *sIII* respectively at 24°C; 18 and 7 preparations for *sII* and *sIII* respectively at 28°C). After addition of pyruvate (10 mM), malate (10 mM), and L-proline (10 mM), fiber bundles were transferred into the respiration chambers to achieve state 2. The following substrates and uncoupler were then sequentially added to the chamber: ADP (5 mM, to achieve state 3 respiration for complex I, CI), cytochrome *c* from equine heart (10 μM, as an index of functional integrity of the outer mitochondrial membrane, Clc), succinate (10 mM, to reach state 3 respiration for complex I + complex II, Clc+CII), *sn* glycerol-3-phosphate (20 mM, to achieve state 3 respiration for complex I + complex II + glycerol-3-phosphate dehydrogenase, Clc+CII+G3Pdh) and 2,4-dinitrophenol (uncoupler, optimum concentration between 5 to 15 μM to reach maximum O₂ flux, Clc+CII+G3Pdh+u). According to Gnaiger (2009), this protocol allowed us to calculate RCR for complex I (CI/state 2), Cytochrome *c* effect (Clc/CI), Uncoupling Control Ratio (UCR, Clc+CII+G3Pdh+u/Clc+CII+G3Pdh), O₂ flux (for CI, Clc, Clc+CII, Clc+CII+G3Pdh and Clc+CII+G3Pdh+u), and Substrate Control Ratio (SCR, ratios of fluxes in the same coupling state for Clc and Clc+CII with Clc+CII+G3Pdh as the reference state). From this point, studies were conducted in two different ways: inhibitors were sequentially introduced to inhibit the overall mitochondrial respiration and COX activity was determined before sodium azide titration was performed and mitochondrial respiration inhibition was measured using sodium azide titration.

3.3.3.2 Inhibitors and COX activity

After mitochondria were uncoupled, the following inhibitors and substrates were introduced in the following order: rotenone (0.5 μ M, inhibitor of complex I, CII+G3Pdh+u), malonate (5 mM, inhibitor of complex II, G3Pdh+u), antimycin A (2.5 μ M, inhibitor of complex III, Rox which corresponds to residual oxygen consumption, reached after inhibition of complexes I, II and III), N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine (TMPD) + ascorbate (0.5 mM and 2 mM respectively, to measure COX activity). After each introduction, oxygen consumption was measured and chemical backgrounds (oxidation rates due to autoxidation of TMPD, ascorbate and cytochrome *c*) as well as instrumental backgrounds were subtracted from the activity (Gnaiger and Kuznetsov, 2002). These subtractions allowed us to calculate O₂ flux (for CII+G3Pdh+u, for G3Pdh+u, for Rox and for COX) and SCR (for CII+G3Pdh+u and for G3Pdh+u with Clc+CII+G3Pdh+u as the reference state).

3.3.3.3 Azide titration experiment

After TMPD + ascorbate were introduced, sodium azide was progressively added at appropriate intervals to inhibit COX activity. The concentrations used for titration were the following: 1, 2, 7, 12, 32, 52, 102, 152, 252, 352, 852, 1352, 3852 and 8852 μ M or until maximum inhibition was achieved. Alternatively, after mitochondria were uncoupled, the same sodium azide titration was performed to progressively inhibit the maximum pathway flux. This titration of maximum pathway flux as well as azide titration of COX activity allowed us to construct plots of relative respiration rate against the percentage of inhibition of COX activity at the same azide concentration (Letellier et al., 1994, Villani and Attardi, 1997). The inhibition constant (K_i) was calculated from transformed data using the Dickson linearization (Kuznetsov et al., 1996). As azide is a non-competitive inhibitor, the flux control coefficient (C_i) was calculated using the following equation:

$$C_i = -(dJ/J)/(dI/K_i),$$

where J is the respiration flux, dJ is the decrement of respiration flux caused by

increment of inhibitor addition dl (between 0 and 50 μM) and K_i is the inhibition constant for sodium azide (Kuznetsov et al., 1996).

Measurements of mitochondrial respiration were averaged for each mitotype at each temperature and for each incubator. Data were expressed as means of respiration rate expressed in pmol of oxygen consumed per second per mg proteins for each mitotype at each temperature and for each incubator.

3.3.4 Enzymatic analyses

PDH activity was measured using a UV/VIS spectrophotometer (Perkin Elmer, Lambda 11, Foster City, CA. USA) equipped with a thermostated cell holder and a circulating water bath. PDH was measured from 16 whole flies (4 from each isofemale line of each mitotype) homogenized in 1600 μl of ice-cold buffer containing 50 mM Tris-HCl, 1mM $MgCl_2$, 0.1% Triton X-100, 1 $mg \cdot ml^{-1}$ BSA, pH 7.8 and centrifuged 3 minutes at 750 g. Each measurement was done in duplicate, and for each incubator, at each temperature and for each mitotype, five different analyses were averaged. Enzymatic activities were expressed in $U \cdot mg^{-1}$ proteins, where U is 1 μmol of substrate transformed per minute.

PDH activity was measured according to Thibeault et al. (1997). NADH production was followed by coupling it to the reduction of iodotetrazolium violet (INT). Briefly, 100 μl of the supernatant were incubated with ice-cold buffer supplemented with 2.5 mM NAD, 0.5 mM EDTA, 0.1 mM coenzyme A, 0.1 mM oxalic acid, 0.6 mM INT, 6 $U \cdot ml^{-1}$ lipoamide dehydrogenase, 0.2 mM thiamine pyrophosphate, pH 7.8. The reaction was initiated with the addition of 5 mM pyruvate (omitted from the control) and the change in absorbance was measured for 5 minutes at 500 nm ($INT\epsilon_{500} = 15.4 \text{ ml} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \mu\text{mol}^{-1}$).

3.3.5 Protein content

At the end of each mitochondrial respiration measurements, fiber bundles were removed and homogenized with a Tekmar homogenizer and the subsequent homogenates were immediately frozen at -80°C for further analyses. Total protein content was determined both for homogenates from fiber bundles and from whole flies in duplicate by the bicinchoninic acid method (Smith et al., 1985). Due to addition of cytochrome *c* during experiments as well as the presence of BSA in the ice-cold buffer and in the respiration medium, the protein content of the buffer was subtracted from the fiber preparations.

3.3.6 Temperature coefficient values

Temperature coefficient (Q_{10}) values for mitochondrial functions (CI, Clc, Clc+CII, Clc+CII+G3Pdh, Clc+CII+G3Pdh+u, CII+G3Pdh+u, G3Pdh+u, COX activity and PDH) were calculated using the following formula:

$$Q_{10} = (\text{Rate 2} / \text{Rate 1})^{10/(t_2-t_1)}$$

where Rate 1 is for the mean rate of the parameter measured at the temperature t_1 , and Rate 2 is the mean rate of the parameter measured at the temperature t_2 . As the different parameters were not measured on the same individuals, Q_{10} were calculated using the mean of each parameter measured at each temperature.

Ratios of the different O_2 fluxes for Clc/COX, Clc+CII/COX and Clc+CII+G3Pdh/COX were also calculated in order to emphasize the possible different proportions of each complex at the different temperatures tested.

3.3.7 Chemicals

All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (Mississauga, ON, Canada).

3.3.8 Statistical analyses

All statistical analyses were performed with SAS software (9.1.3, SAS Institute, Cary, IN, USA). O'Brien's test was used to verify homogeneity of data. No differences between incubators were detected for any of the parameters measured and consequently, analyses of variance (ANOVA) with two independent variables (temperature and mitotype, the variable incubator has been discarded) were performed using a general linear model (GLM) procedure with the least square means method for multiple comparison tests. This allowed us to determine any interactions between the variables, and the effect of each variable on the different parameters measured. Significance was defined at $P < 0.05$.

3.4 Results

Data from incubators A and B were pooled giving 14 to 40 different preparations according to the temperature and the mitotype tested (38 and 24 preparations for *sII* and *sIII* respectively at 12°C; 32 and 40 preparations for *sII* and *sIII* respectively at 18°C; 26 and 38 preparations for *sII* and *sIII* respectively at 24°C; 36 and 14 preparations for *sII* and *sIII* respectively at 28°C) and 10 different homogenates for enzymatic analyses for each mitotype at each temperature. Consequently, F and P were presented only for the factors "temperature" and "mitotype" and their interaction (Table 3.1). Statistical values cited in the text are those obtained with the Least Squares method to simplify presentation of the results.

For oxygen fluxes and consequent RCR, UCR and SCR, R_{ox} was subtracted from initial oxygen fluxes measured.

Table 4.1 Analyses of variance results showing *F* ratios with two different variables (mitotype and temperature).

	Error <i>df</i>	Mitotype <i>df</i> = 1	Temperature <i>df</i> = 3	Mitotype*Temperature <i>df</i> = 3
RCR	190	0.11	2.68*	0.15
Respiration rates				
CI	98	5.41	5.4*	1.79
CIc	98	6.53*	3.75	1.53
CIc+CII	98	6.16*	2.67	1.03
CIc+CII+G3Pdh	98	10.07*	2.52	1.09
CIc+CII+G3Pdh+u	98	10.38*	3.14*	1.29
CII+G3Pdh+u	98	7.43*	3.36*	1.13
G3Pdh+u	98	8.32*	2.17	1.21
COX	98	5.4*	7.33*	0.72
SCR				
CIc	222	0.47	2.65*	1.01
CIc+CII	222	0.33	1.67	0.3
CII+G3Pdh+u	103	3.55	11.88*	0.7
G3Pdh+u	103	0.76	6.31*	1.1
Metabolic control				
Ki	102	1.45	93.81*	0.17
Ci	125	27.58*	157.87*	1.22
Enzymatic analyses				
PDH	65	0.03	26.17*	0.33

*P<0.05

3.4.1 Fly sampling

Every line from the two groups (*sII* and *sIII*) was pooled due to low intrahaplogroup variation (Katewa and Ballard, 2007). The resulting pools of isofemale lines were not different for mean mass between mitotypes or between incubators (0.685 ± 0.070 mg for *sII* incubator A; 0.674 ± 0.061 mg for *sII* incubator B; 0.679 ± 0.079 mg for *sIII* incubator A; 0.686 ± 0.071 mg for *sIII* incubator B).

3.4.2 Respiratory Control Ratios

RCRs were calculated for complex I as $CI/state2$ (Gnaiger, 2007) and results are presented in Fig. 3.1. RCRs obtained using substrates for complex I indicate a well-coupled respiration. No significant differences were detected between mitotypes. RCRs were only influenced by temperature (Table 3.1), and were maximum at 24°C but differences among temperature were significant only for *sII* from 12 to 24°C (P -values <0.01) and between 24 and 28°C ($P<0.0001$).

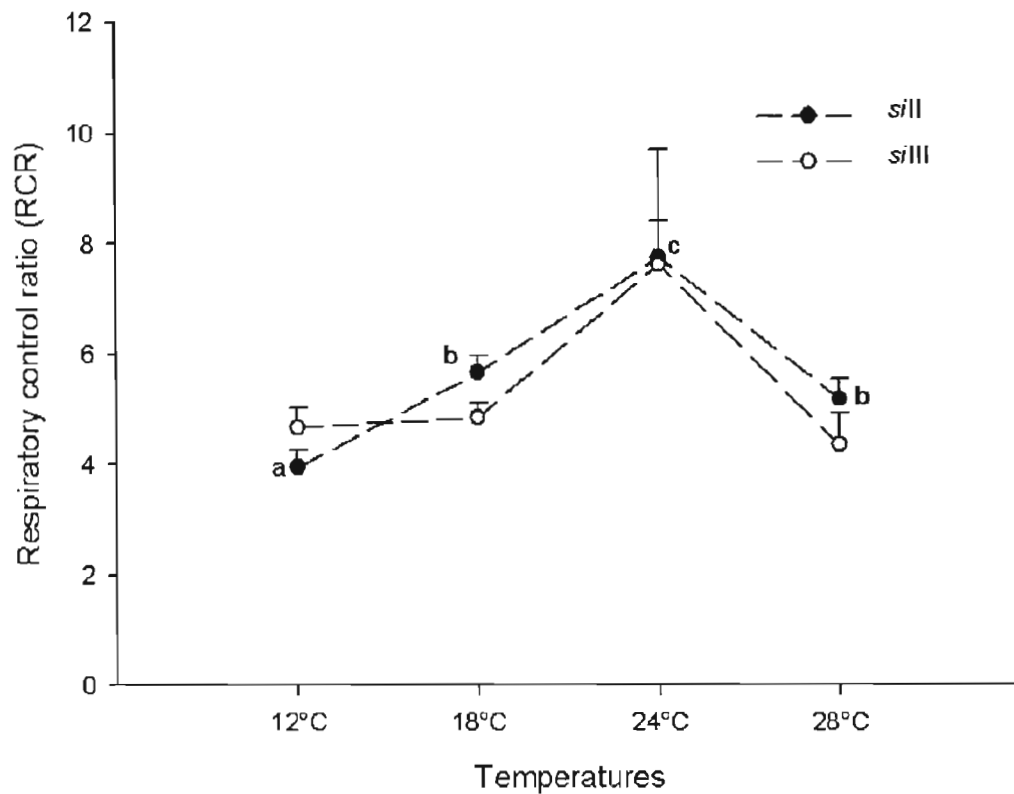


Figure 3.1 Effect of temperature on Respiratory Control Ratio ($RCR = CI/state2$) when fibers preparations from the two mitotypes, *sII* and *sIII*, were supplied with pyruvate+malate+L-proline (state2) +ADP (CI) at the complex I level. Results are means \pm SE for 14 to 40 fibers preparations. Significance was set as $P<0.05$; letters denote differences between temperatures with a statistically different from b and c, b statistically different from c.

3.4.3 Cytochrome *c* effect and Uncoupling Control Ratio

To determine if mitochondrial integrity was disrupted, O₂ flux was compared before and after cytochrome *c* injection. Ratios of Clc/CI showed little effects of cytochrome *c* addition on the mitochondrial respiration (Clc/CI ratios were not significantly different from 1, results not shown), denoting functional integrity of outer mitochondrial membrane. No significant differences between mitotypes were observed although a slight (but not significant) decrease was detected from 12 to 28°C.

O₂ flux was compared before and after the addition of an uncoupler to see if the ATPase exerted a limitation on the mitochondrial respiration. No significant differences were detected between mitotypes or among temperatures and all UCRs were close to 1 (results not shown) which denotes that ATP synthesis capacity (ATP synthase) can support the maximum respiration rates observed with the experimental substrates used. These results are consistent with previous results on mitochondrial isolations (Pichaud et al., 2010).

3.4.4 Respiration rates

Comparisons of respiration rates between the *in situ* approach and the *in vitro* approach (Pichaud et al., 2010) showed that respiration rates in permeabilized fibers were almost always lower than with isolated mitochondria (Table 3.2). General Linear Model showed that mitotype influenced the respiration rates for Clc, for Clc+CII, for Clc+CII+G3Pdh, for Cl+CII+G3Pdh+u, for CII+G3Pdh+u, for G3Pdh+u and for COX while only temperature influenced the respiration rates for CI, for Clc+CII+G3Pdh+u, for CII+G3Pdh+u and for COX (Table 2.1). As shown in Fig. 3.2, no significant differences were noted between mitotypes at either 12, 18 and 28°C. However, at 24°C, significant differences were detected for Clc+CII+G3Pdh, Clc+CII+G3Pdh+u, CII+G3Pdh+u, G3Pdh+u and for COX ($P=0.02$, $P=0.015$, $P=0.027$, $P=0.031$ and $P=0.036$ respectively). A difference was detected between temperatures for complex IV in *siII* where results showed that COX activity was significantly higher at 28°C than at the other temperatures ($P\text{-values}\leq 0.012$).

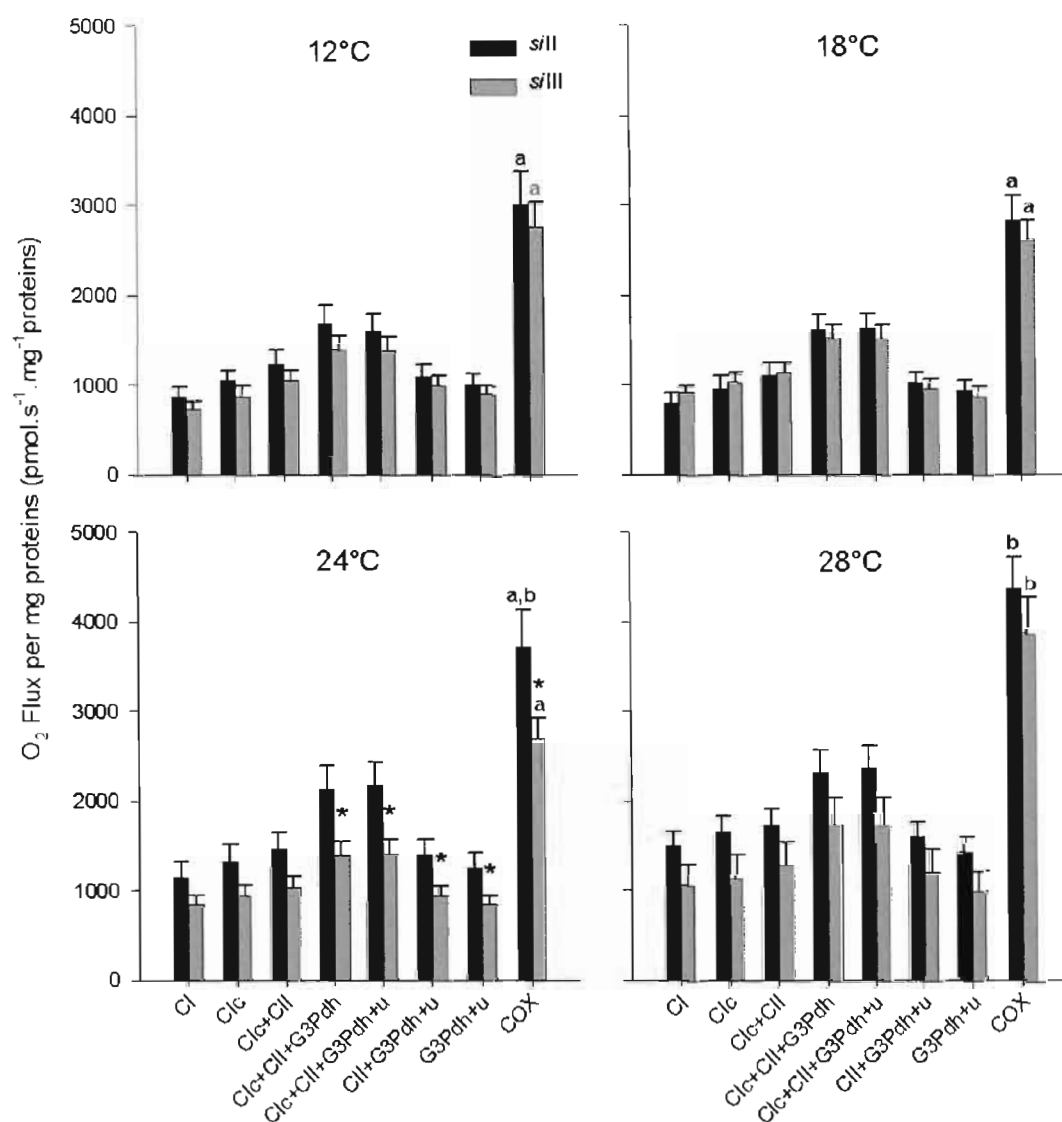


Figure 3.2 Mitochondrial functions measured at four different temperatures in permeabilized fibers from the two mitotypes of *Drosophila simulans* *sIII* and *sIII*. O_2 fluxes are expressed as pmol O_2 consumed per second per mg proteins with pyruvate+malate+L-proline+ADP (Cl), + cytochrome *c* (Clc), +succinate (Clc+CII), +sn glycerol-3-phosphate (Clc+CII+G3Pdh), +2,4-dinitrophenol (Clc+CII+G3Pdh+u), +rotenone (CII+G3Pdh+u), +malonate (G3Pdh+u), +antimycin A (Rox) +TMPD+ascorbate (COX) and were corrected for Rox. Results are means \pm SE for 7 to 20 fibers preparations. Significance was set as $P < 0.05$; * denotes differences between mitotypes; letters denote differences between temperatures with a statistically different from b.

Table 5.2 Comparisons of mitochondrial functions measured at four different temperatures in isolated mitochondria, in permeabilized fibers, and in permeabilized fibers corrected for Rox from the two mitotypes of *Drosophila simulans* *sII* and *sIII*. O₂ fluxes are expressed as pmol O₂ consumed per second per mg proteins.

Temperatures	<i>sII</i>	<i>sIII</i>	<i>sII</i>	<i>sIII</i>	<i>sII</i>	<i>sIII</i>
	Mitochondrial isolation		Permeabilized fibers		Permeabilized fibers corrected for Rox	
12°C	1113.33	1233.67	1106.15	866.92	870.03	731.68
18°C	1390.50	1148.50	908.20	1074.01	797.12	910.67
24°C	2439.67	2353	1261.20	984.94	1153.12	840.95
28°C	1499.17	1614	1666.77	1237.25	1499.44	1055.04

The *sII* mitotype did not show any significant differences between 12, 18 and 24°C or between 24 and 28°C. Nevertheless, all parameters were significantly higher at 28°C when compared with 12 and 18°C (P-values≤0.0415).

3.4.5 Substrate Control Ratio (SCR)

SCR allowed us to determine the effect of each substrate addition on the mitochondrial respiration. For Clc and Clc+CII, the reference state was chosen as Clc+CII+G3Pdh while for CII+G3Pdh+u and G3Pdh+u, the reference state was taken as Clc+CII+G3Pdh+u. Temperature was the only factor that influenced SCR for Clc, for CII+G3Pdh+u and for G3Pdh+u (Table 3.1). Results for SCR (Fig. 3.3) showed no significant differences between mitotypes at any temperatures for Clc and Clc+CII. The mitotype *sII* had lower SCR than *sIII* for CII+G3Pdh+u/ as well as for G3Pdh+u at 24°C (P=0.037 and P=0.048 respectively). Interestingly, significant increases in SCRs were denoted when succinate is added as substrate for *sII* at 12 and 18°C (P-values≤0.048) and for *sIII* at all temperatures (P-values≤0.042).

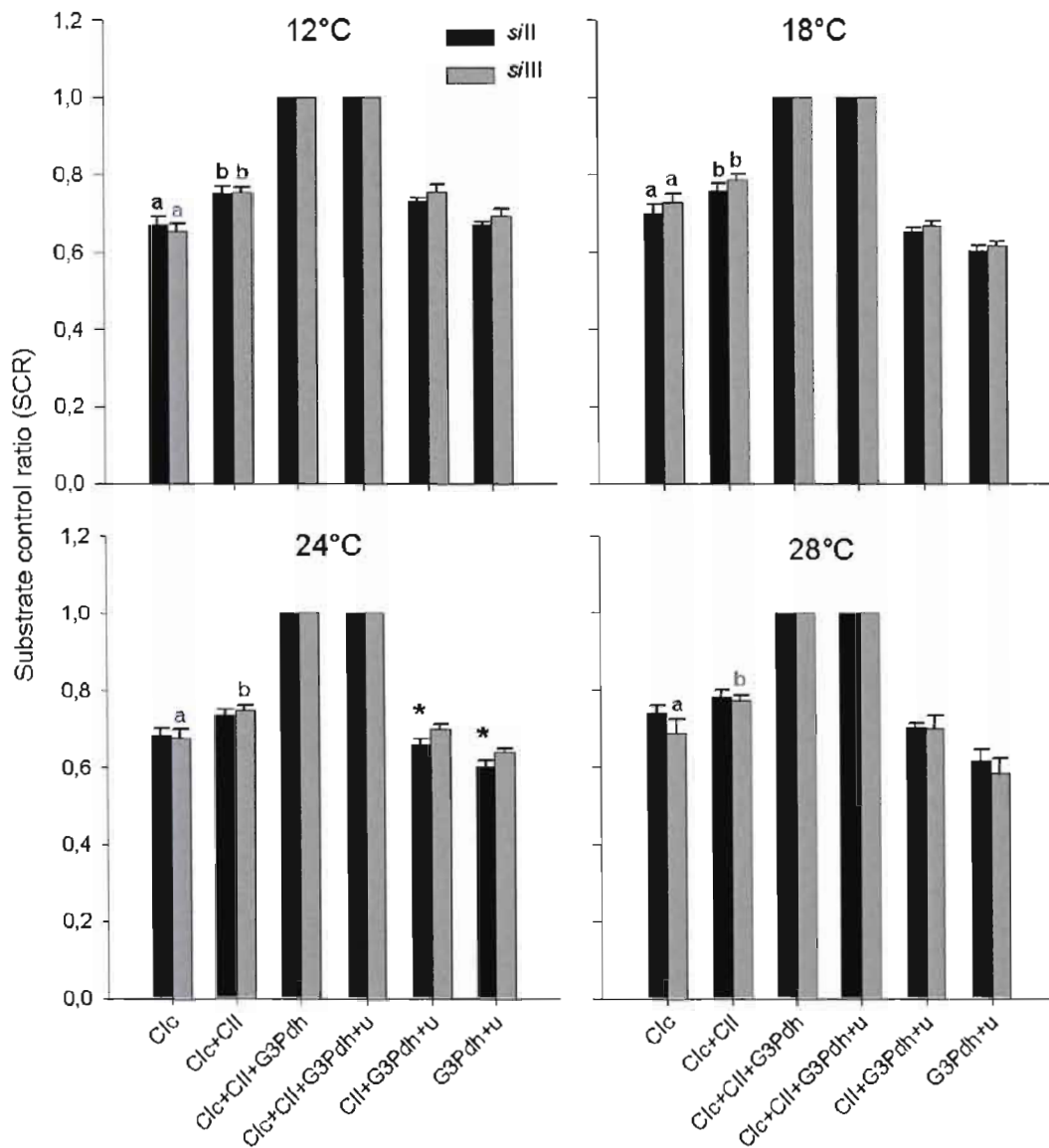


Figure 3.3 Substrate Control Ratio (SCR) calculated at four different temperatures in permeabilized fibers from the two mitotypes, *sII* and *sIII*, with Clc+ClI+G3Pdh as reference state for Clc and Clc+ClI SCRs and with Clc+ClI+G3Pdh+u as reference state for ClI+G3Pdh+u and G3Pdh+u SCRs. Results are means \pm SE for 7 to 20 fibers preparations. Significance was set as $P < 0.05$; * denotes differences between mitotypes; letters denote differences obtained after addition of succinate with a different from b.

3.4.6 Cytochrome c oxidase excess capacity and flux control coefficient

We next examined the apparent excess capacity of COX at high flux through the ETS using a combination of substrates that maximally reduces complexes I and II and G3Pdh. Azide titration resulted in hyperbolic inhibition of COX. Threshold plots display overall flux as a function of COX activity; the threshold for inhibition of COX is defined as the intercept of the initial slope with the linear fit of the final slope (Fig. 3.4A). The apparent excess capacity of COX is the intercept of the extrapolation of the linear regression for the final slope with the axis at zero COX inhibition. In accordance with our previous results using the *in vitro* approach (Pichaud et al., 2010), we detected a threshold and consequently a COX excess capacity at 12°C for both mitotypes (188%, $R^2=1$ for *sII* and 230%, $R^2=0.995$ for *sIII*). No COX excess capacity was detected at 18, 24 and 28°C for both mitotypes and comparisons were made between the different K_i and C_i (Fig. 2.4B,C). K_i was only influenced by temperature (Table 3.1) and no significant differences were observed between mitotypes. Both mitotypes had an increasing K_i with increasing temperatures, with significant differences at 24 and 28°C compared with the two other temperatures ($P\text{-values}\leq 0.036$). Interestingly, C_i was influenced both by mitotype and temperature (Table 3.1). Significant differences between mitotypes were denoted at all the temperatures tested ($P\text{-values}\leq 0.041$) and a significant increase was also detected for both mitotypes between 24 and 28°C ($P\text{-values}< 0.001$). At every temperature, the control coefficient at the COX level was higher for *sIII* which might be reflected by the lower excess of COX at 12°C as well as the lower activity for this mitotype.

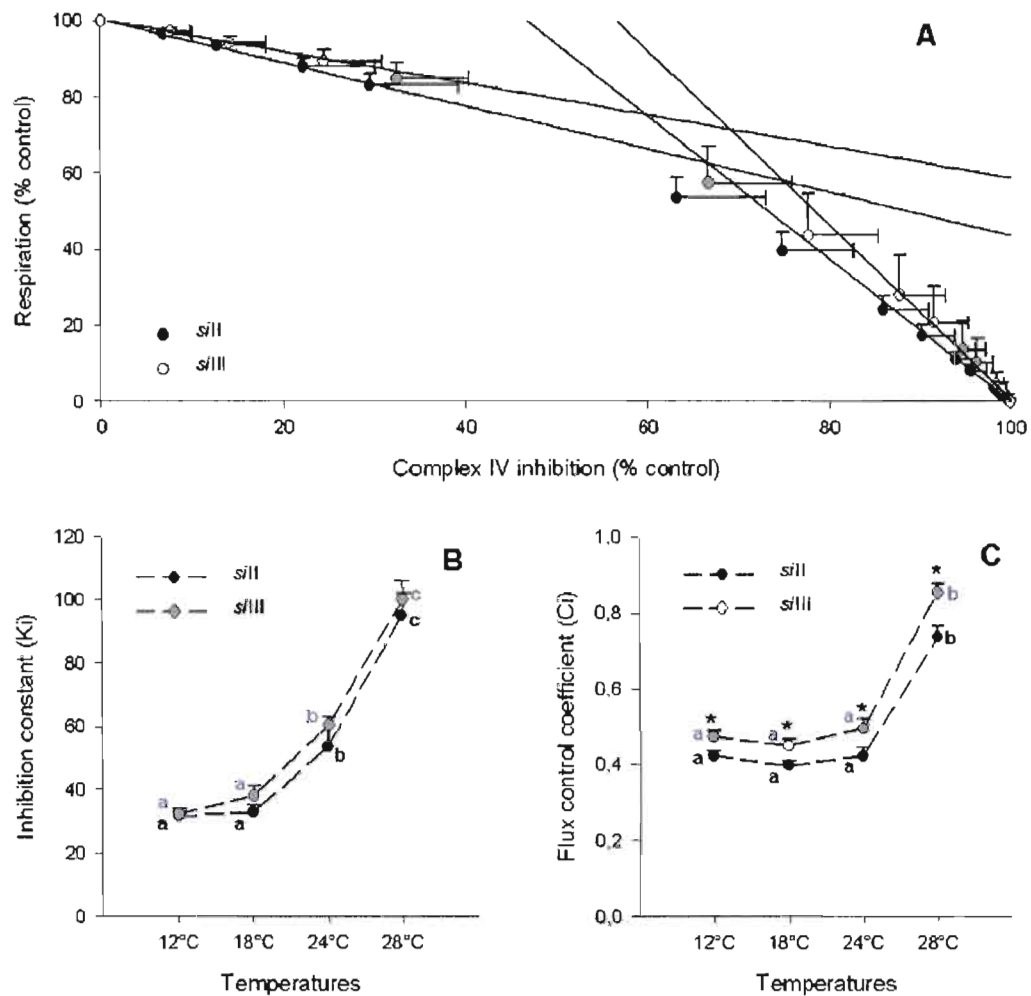


Figure 3.4 (A) Apparent COX excess capacity measured at 12°C in two mitotypes studied, *sII* and *sIII*. The COX excess capacity is represented by the threshold plot, which shows the relative flux through the ETS as a function of relative inhibition of COX at similar azide concentrations. Two linear regressions were calculated from initial and final slopes, and extrapolated to zero COX inhibition (*sII*, $R^2=0.9962$ and $R^2=1$ respectively; *sIII*, $R^2=0.9951$ and $R^2=0.9954$ respectively). The intercepts are the COX excess capacity (see text below). Results are means \pm SD. (B) Values of inhibition constant (K_i) of sodium azide calculated from transformed data using the Dickson linearization and (C) values of flux control coefficient (C_i) calculated according to the following formula: $C_i = -(dJ/J)/(dI/K_i)$ in the *sII* and *sIII* mitotypes at the four different temperatures. Results are means \pm SE for 7 to 20 fibers preparations for mitochondrial respiration inhibition and for 7 to 20 fibers preparations for COX activity inhibition. Significance was set as $P < 0.05$; * denotes differences between mitotypes; letters denote differences between temperatures with a statistically different from b and c, b statistically different from c.

3.4.7 Enzymatic analyses

The enzymatic activity of PDH was measured to evaluate the entry of the electrons into the ETS at the level of complex I. PDH activity was only influenced by temperature (Table 3.1). No significant differences were detected between mitotypes (Fig. 3.5) at any temperature. PDH activity presented no significant differences for both mitotypes between 18 and 24°C but significant increases were noted between 12 and 18°C, as well as between 24 and 28°C ($P\text{-values} \leq 0.037$).

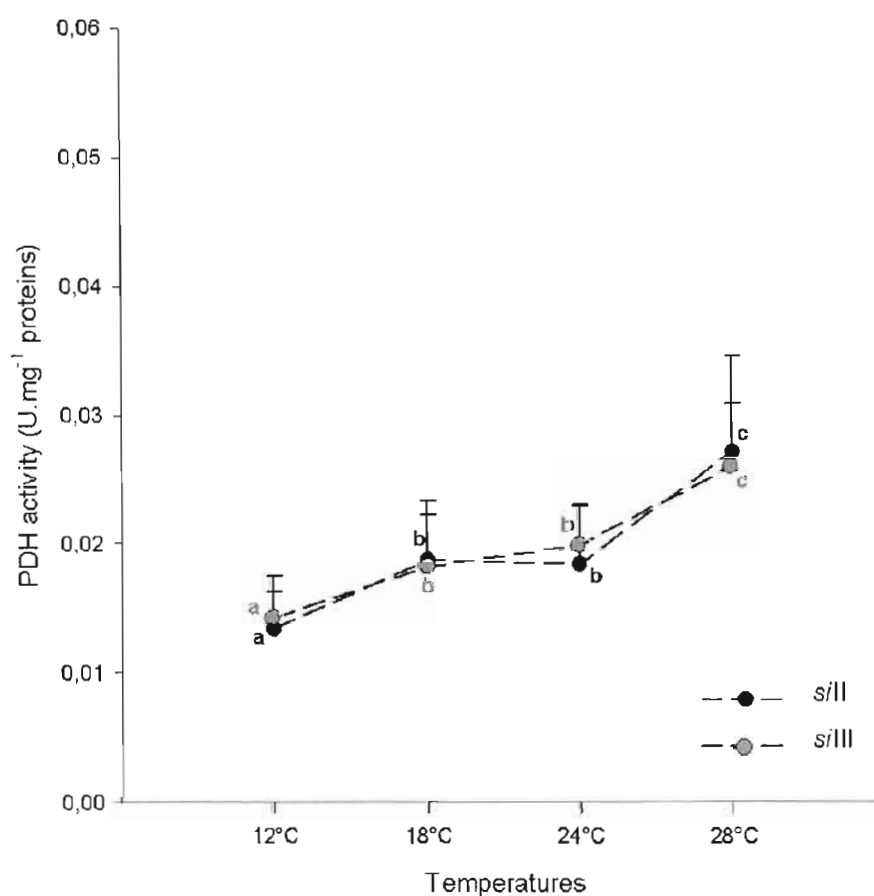


Figure 3.5 Mean (\pm SD) of PDH activities of *Drosophila simulans* mitotypes sII and sIII measured in 10 different homogenates per mitotype per temperature. Significance was set as $P < 0.05$; letters denote differences between temperatures with a statistically different from b, c and d, b statistically different from c and d, c statistically different from d.

3.4.8 Effects of temperature

Results for Q_{10} are presented in Fig. 3.6. A difficulty with the calculation of Q_{10} relate in the fact that inter-individual variations are erased. It is therefore not possible to perform statistical analysis. Results can however be used to hypothesize some general patterns. For both mitotypes, Q_{10} of ETS complexes appear to be lower in the lower of temperature range and the highest Q_{10} are reached in the range of 24 to 28°C. The most evident difference between mitotypes is at the level of COX thermal sensitivity at the highest temperature range with a Q_{10} of 2.49 for *sIII*. The same pattern is observed for PDH with higher Q_{10} at higher temperatures and no divergences between mitotypes. Interestingly, as we have shown, temperature influenced the respiration rates for CI, for Clc+CII+G3Pdh+u, for CII+G3Pdh+u and for COX, the SCRs for Clc, CII+G3Pdh+u and G3Pdh+u, the K_i and the C_i , as well as the PDH activity (Table 3.1).

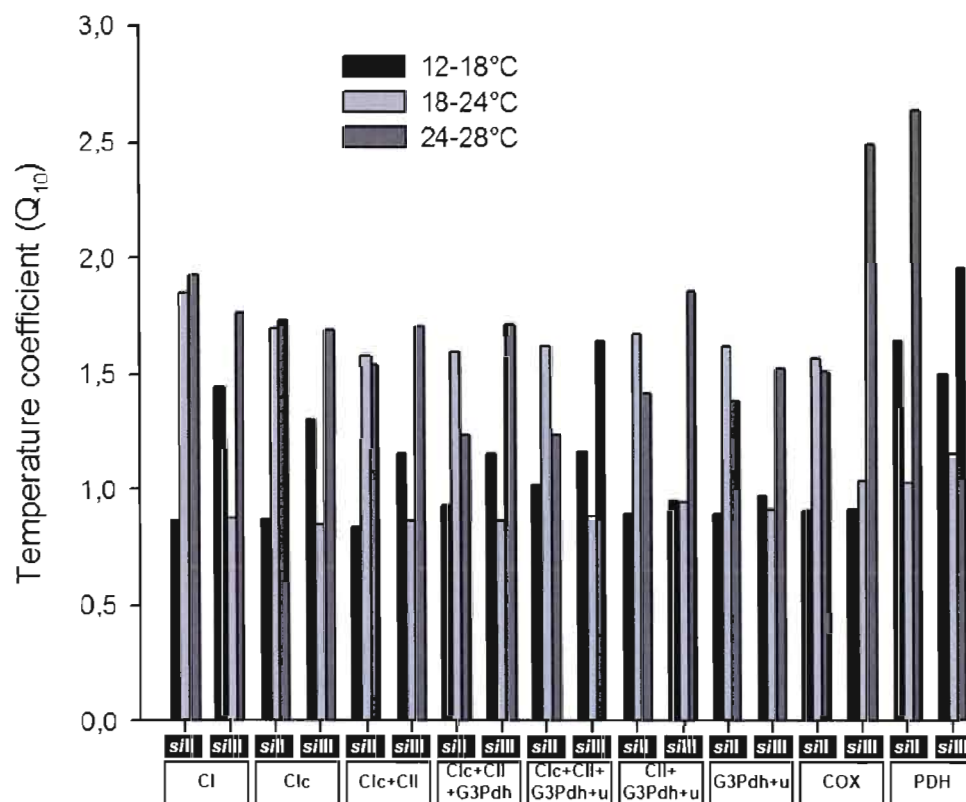


Figure 3.6 Temperature coefficients (Q_{10}) for mitochondrial respiratory fluxes with pyruvate+malate+L-proline+ADP (CI), + cytochrome c (Clc), +succinate (Clc+CII), +sn glycerol-3-phosphate (Clc+CII+G3Pdh), +2,4-dinitrophenol (Clc+CII+G3Pdh+u), +rotenone (CII+G3Pdh+u), +malonate (G3Pdh+u), +antimycin A (Rox) +TMPD+ascorbate (COX) and were corrected for Rox, and for pyruvate dehydrogenase (PDH) activity. Q_{10} values for mitochondrial functions were calculated according to the following formula: $Q_{10} = (\text{Rate}_2 / \text{Rate}_1)^{10 / (t_2 - t_1)}$. Results are means for 7 to 20 fibers preparations.

3.5 Discussion

This study is aimed at identifying differences in mitochondrial performance and thermal sensitivity between populations of *D. simulans* with divergent mitochondrial haplotypes using an *in situ* approach, close to the physiological conditions and to compare the results obtained with previous experiment using an *in vitro* approach (on mitochondrial isolations). To our knowledge, this is the first study to use permeabilized fibers of invertebrates to evaluate the impact of temperature variations on mitochondrial performances. We developed here a new approach that allowed us to compare accurately different steps of the ETS even with little differences in oxygen consumption and that may be applied to investigate impact of environmental conditions on mitochondrial functions. Moreover genetic divergences in mtDNA which may be related to divergences at the level of the metabolic efficiency can be addressed as an evolutionary determinant of metabolic adaptations.

The respiratory control ratios obtained with the new method showed well-coupled respiration (between 4.0 and 7.8 according to the mitotype and the temperature), consistent with previous RCRs measured in isolated mitochondria (ranging from 5.3 to 8.3) using the same substrates and the same temperatures (Pichaud et al., 2010). The cytochrome *c* effect was very low at any experimental temperature confirming functional integrity of the outer mitochondrial membrane. These results confirm that the *in situ* method used was appropriate to evaluate the mitochondrial functions and might be even more relevant than *in vitro* approach since the cellular environment is preserved.

Results for UCRs showed that when the ETS is “nearly saturated” with electrons from substrates, no effect of uncoupling can be detected suggesting that ATP synthesis capacity can support the maximum electron flux through ETS with the combination of substrates that we used as already demonstrated (Pichaud et al., 2010). Since O₂ fluxes for Clc+CII+G3Pdh and for Clc+CII+G3Pdh+u are almost identical, phosphorylation of ADP does not appear to be the limiting step in the present experimental conditions. Consequently, the control of mitochondrial

respiration may be exerted mostly upstream of ATP synthase.

Comparisons of the respiration rates between the two methods showed that O₂ fluxes with pyruvate+malate+L-proline were lower with permeabilized fibers. It certainly arises in part from the correction of residual oxygen consumption in the *in situ* approach (Table 3.2). Moreover, it appears logical that permeabilized fibers from 4 or 8 thoraxes gave respiration rates lower than with mitochondrial isolations from 160 thoraxes (Pichaud et al., 2010) when expressed on overall protein content in either mitochondrial isolations or permeabilized fibers, explaining the differences between the two methods.

The most striking difference between this study and the previous method employed (Pichaud et al., 2010) is in the use of substrates. In Pichaud et al. (2010), we used the substrates to investigate the entry of electrons through the ETS at the level of complex I (with pyruvate+malate+L-proline) or at the level of complex III via glycerol-3-phosphate dehydrogenase (with *sn* glycerol-3-phosphate). However, a more integrative approach is needed (e.g. complex I + complex II + G3Pdh) to delineate the electrons management at individual steps of the ETS and that is why we used the *in situ* approach. In physiological conditions, mitochondrial respiration is supported by electron input from different NAD⁺-linked and FAD-linked complexes (mainly complex I, complex II and G3Pdh) into the Q-cycle. Moreover, NAD⁺-linked and FAD-linked substrates enter the ETS at the same time since when the tricarboxylic acid (TCA) cycle is activated, it produces NADH and FADH₂. In this experiment, we fed the TCA cycle by providing pyruvate, malate, and L-proline which allowed generation of NADH through pyruvate dehydrogenase, malate dehydrogenase and glutamate dehydrogenase whereas succinate and *sn* glycerol-3-phosphate were used to generate FADH₂ via succinate dehydrogenase and glycerol-3-phosphate dehydrogenase in order to reproduce the real physiological conditions. Additive effect of substrate combinations on the O₂ flux using strategic design of complex I + complex II protocols has been the approach of different studies (Lemieux et al., 2006; Boushel et al., 2007; Aragonés et al., 2008; Gnaiger, 2009) and on different fiber preparations from various mammalian tissues to delineate the

implication of the different complexes in the level of state 3 respiration. In *Drosophila*, impact of substrate combination has been investigated for NAD⁺-linked substrates (Miwa et al., 2003; Ferguson et al., 2005; Katewa and Ballard, 2007) but importance of FAD-linked substrates is still poorly explored. Since the rate of mitochondrial respiration with succinate is quite low, it has been suggested that succinate does not readily cross the inner mitochondrial membrane (Van Den Bergh and Slater, 1962; Ferguson et al., 2005) while *sn* glycerol-3-phosphate is always preferred as FAD-linked substrate (but see Walker et al., 2006). Indeed, respiration rates for succinate were very low but can be greatly increased by breaking up mitochondria (Van Den Bergh and Slater, 1962), leading to the conclusion that insect mitochondria were impermeable to succinate. Using SCR as expression of the relative control exerted by variation of experimental substrates at a fixed coupling state (Gnaiger, 2009), our results clearly demonstrate that the addition of succinate has a significant impact on the respiration rate (Fig. 3.3) of *Drosophila* and it is therefore essential to take into account the complex II as a converging branch to the Q-junction. Moreover, complex II is only encoded by nuclear genome and, since no differences between mitotypes were detected in SCR or in O₂ fluxes for Clc+CII (Fig. 3.2 and 3.3) when comparing with Clc alone, we could suggest that the nuclear genes involved have weak impact on divergences of mitochondrial functions between these two populations. These results are in line with performed enzymatic assays since PDH, also encoded by nuclear genes, did not show differences between mitotypes at any of the temperature tested.

Study of the functional design of the OXPHOS system requires a conceptual transition from a strict analysis of the ETS to a perspective of the convergent structure of electron flow to the Q-junction (Gnaiger, 2009). In comparative analyses of the involvement of ETS on the overall mitochondrial capacity and regulation, it is therefore essential to investigate the electron flux at the Q-junction with maximum capacities of all contributory branches converging at the Q-junction. In our study, the protocol was designed to evaluate the substrate combination effect in terms of O₂ consumption with three different electrons input (complex I, complex II and G3Pdh)

through the ETS. Respiration rates showed that when supplying ETS with substrates from three branches (C1c+CII+G3Pdh), significant differences between mitotypes were detected at 24°C, and these differences were also observed when uncoupler was added (C1c+CII+G3Pdh+u) as well as when inhibitors of the complexes I or II were used (CII+G3Pdh+u and G3Pdh+u). These results suggest higher catalytic capacity of the ETS from the *sII* population. This divergence is clearly significant at 24°C and is still apparent at 28°C. These differences are significant at the highest flux of electron (C1c+CII+G3Pdh and C1c+CII+G3Pdh+u), when complexes I and II are inhibited (CII+G3Pdh+u and G3Pdh+u) and for the COX activity. It is possible that the higher flux for *sII* is induced by higher rate of electron entry at the G3Pdh level but this enzyme is only encoded by nuclear DNA and we may assume that the G3Pdh was not different between the two mitotypes. This leaves us to suspect that the catalytic advantage should be associated to the ability of complexes III and IV to deplete electrons, which is in line with the higher level of COX activity in *sII*.

Maximal COX activity is higher in *sII* at 24°C (Fig. 3.2) pointing out the importance of COX catalytic capacity to modulate the overall respiration rate. The apparent COX excess capacity was measured at high pathway flux with the three branches fully fuelled in electrons (Fig. 3.4A). A relatively important excess was observed only at 12°C, with an excess of about 188% in *sII* and 230% in *sIII*. We already demonstrated marked excess of COX at low temperature in isolated mitochondria (excess of 604% for *sII* and 613% for *sIII*; Pichaud et al., 2010). Other studies have demonstrated that in isolated mitochondria, apparent COX excess was higher than in permeabilized fibers (Villani and Attardi, 1997; Kunz et al., 2000). These differences between the *in vitro* and the *in situ* studies and the much higher excess in mitochondrial preparations likely arise from different experimental conditions as well as from the appropriate microenvironmental conditions of the *in situ* experimentation. For example, we used higher number of substrates in this study (pyruvate+malate+L-proline+succinate+sn glycerol-3-phosphate) than we did in isolated mitochondria (pyruvate+malate+L-proline+sn glycerol-3-phosphate). Since it is known that the apparent excess capacity of cytochrome c oxidase is lower

at higher flux (for example using glutamate+malate+succinate compared to the flux using glutamate+malate; for a review see Gnaiger, 2009), the higher state 3 with succinate could partly explain the lower excess in fiber preparations. The small increment of state 3 with succinate addition could hardly however explain an increment of excess from approximately 200% to around 600%. A most parsimonious hypothesis would be that mitochondria from mitochondrial preparations couldn't attain the state 3 level reached by mitochondria from permeabilized fibers at low temperatures but it remains to be verified.

From 18 to 28°C, no excess capacity of COX was detected, suggesting that the maximal, uninhibited COX activity could not support higher respiration rates than maximal state 3 measured at these temperatures. However at 12°C the excess reveal much higher catalytic capacity than what is required to support the maximum state 3. Limitation should therefore come from reactions upstream cytochrome *c* oxidation. Since the relative activity of the different complexes does not vary when compared to COX at the different temperatures, this discards the possibility that a major limitation arises from other complexes of ETS leaving us to conclude that it could be induced by impairment at the level of dehydrogenases, where electrons are provided. We cannot confirm this hypothesis but results on PDH activity highly suggest that at 12°C this enzyme cannot support high flux of electron entry into the ETS, leading to the observed apparent COX excess capacity.

At 12, 18 and 24°C, COX exerts a relatively low control over the OXPHOS capacity (Fig. 3.4C) compared to 28°C. At this higher temperature, OXPHOS capacity seems principally controlled by COX. The control of OXPHOS capacity should therefore be more evenly distributed over the different complexes of the ETS at 12, 18 and 24°C. Even at 12°C where high excess of COX was measured, COX maintained a significant control force over state 3 respiration. This is quite intriguing since Chamberlin (2004) in her top-down approach denoted that despite the fact that temperature affected the kinetics of all subsystems (substrate oxidation, phosphorylation and proton leak), the control of respiration did not change according to the temperature. However, this study considers the substrate oxidation system

(including TCA cycle, electron transport chain and metabolite transporters) as a whole system. While it is possible that the proportion of the control carried out by this system does not vary with temperature, it is still possible that the distribution of control among the complexes or reactions inside this system does vary.

In terms of thermal sensitivity, important divergences were denoted between mitotypes that should be interpreted cautiously due to the calculation of Q_{10} . Both mitotypes show low thermal sensitivity in the range from 12 to 18°C and *sIII* showed also weak impact of temperature in the range 18-24°C (Q_{10} close to 1). In the range 18-24°C, *sII* has 1.5 to 2 fold higher Q_{10} than *sIII* whereas in the range 24-28°C, *sIII* has the higher Q_{10} for almost all parameters except CI and Clc. Moreover, the Q_{10} for COX for *sIII* at this temperature range showed the highest values which denote a strong influence of the temperature on this mitotype but only for the complex IV. The Q_{10} for PDH also exhibit high values for this range. This clearly suggests that the differences noticed between both mitotypes are induced by divergences in the functional properties of the component of the ETS and not by simple quantitative adjustments. Even if this suggestion seems weak, due to the method used to calculate the Q_{10} value, temperature influence determined by analyses of variance (Table 3.1) also supports this hypothesis. The overall lower Q_{10} values from 12 to 18°C might allow *sII* to colonize different spatial niches, which is in line with its wider worldwide distribution while *sIII* is endemic to continental east Africa, Madagascar and Reunion Island (Ballard, 2004). This spatial niche differentiation hypothesis does not however exclude the possible temporal niche differentiation (diurnal or seasonal differences in haplotype performance/abundance) (Pichaud et al., 2010).

No distinctions between the ratios of each complex related to COX were detected among experimental temperatures. This is quite surprising since the different enzymes of the ETS should have different thermal sensitivities which are partly governed by the catalytic properties of enzymes and particularly by the free energy of activation of the reaction (Somero, 2004; Daniel et al., 2008). Temperature-induced changes should then affect differently the different enzymes of the ETS (and particularly complexes III and IV) and consequently the control over

the respiration should be differently distributed along the ETS at different temperatures. According to our results, it appears that the control exerted by COX is little affected by temperature in a wide range of temperatures encountered by the species (12 to 24°C). All together, these results indicate a robust nature of the functional and regulatory properties of the ETS, which allow supporting wide range of temperature changes.

3.6 Perspective and significance

We have shown in this study that the *in situ* approach for the assessment of mitochondrial performances is appropriate for invertebrate species and may be more relevant than the *in vitro* approach since cellular interactions are preserved in permeabilized fibers. We also showed that providing succinate increases respiratory rates in *Drosophila* (it may certainly be only detected in permeabilized fibers with high resolution respirometry as other studies on mitochondrial isolations didn't detect any effects). Therefore, it must be taken into account when evaluating the capacity of all branches of the ETS converging at the Q-junction and the consequent impact on mitochondrial respiration. The apparent COX excess capacity detected at 12°C may be due to impairment in process upstream that drive the electron input into the ETS. These results are partly corroborated by assays of a specific dehydrogenase (PDH) which showed low activity at 12°C. Higher catalytic capacities of ETS were detected at 24°C for the *sll* mitotype and this catalytic advantage should be associated to the ability of complexes III and IV to deplete electron. The different thermal sensitivity of the two mitotype ETS complexes could result from selection on these mitotype to better perform in their specific environment but we cannot however conclude that the difference resides entirely at the level of mtDNA as hitherto undetected differences in nuclear genes may exist. Introgressions between mitotypes may shed light on the adaptive value of *Drosophila* mitochondria in co-adapted cellular environments and will allow us to delineate the relation between respiration rates and mtDNA

divergences. However, our study clearly demonstrates that the ETS is a robust system in terms of functional and regulatory properties, which allow supporting wide range of temperature changes.

3.7 Acknowledgments

Many thanks are due to H. Lemieux for her help with experimental protocols and to E. Hébert Chatelain for help with animals maintenance. R.M. Tanguay work is supported by a grant from the Canadian Institute of Health Research. This study was supported by research grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) to P.U. Blier.

CHAPITRE IV

DISRUPTION OF MITOCHONDRIAL FUNCTION IN INTROGRESSED *DROSOPHILA SIMULANS* AND THE ADAPTIVE VALUE OF MITOCHONDRIAL DNA

Nicolas Pichaud¹, J William O Ballard², Robert M Tanguay³, and Pierre U Blier¹

¹ Laboratoire de biologie intégrative, Département de Biologie, Chimie, Géographie Université du Québec à Rimouski, 300 Allée des Ursulines, Rimouski, Québec, Canada G5L 3A1 (N. Pichaud : conception du projet, expérimentation, analyse des données, rédaction de l'article et conception des figures; P.U. Blier : aide à la rédaction).

² School of Biotechnology and Biomolecular Sciences, University of New South Wales, Sydney 2052, Australia (J.W.O. Ballard: aide à la redaction).

³ Laboratoire de Génétique Cellulaire et développementale, Département de Biologie Moléculaire, Biochimie Médicale et Pathologie, Institut de Biologie intégrative et des systèmes, 1030 ave de la Médecine, Université Laval, Québec, Canada G1V 0A6 (R.M. Tanguay : aide à la rédaction).

À soumettre dans *Evolution*. Les références citées dans l'article sont reportées à la fin de la thèse.

4.0 Résumé

L'objectif de cette étude était de déterminer si les différences des propriétés catalytiques des mitochondries étaient conférées par des divergences observées dans l'ADN mitochondrial. Pour cela, nous avons utilisé deux populations de *Drosophila simulans* (*sII* et *sIII*) et nous avons évalué les propriétés fonctionnelles de ces haplotypes en utilisant une approche *in situ* (sur des fibres perméabilisées). Quatre lignées isofemelles introgressées (*sII*-introgressé) possédant l'ADNmt de *sII* et l'environnement nucléaire de *sIII* ainsi que quatre lignées maintenues (*sIII*-contrôle) possédant l'ADNmt et l'ADN nucléaire de *sIII* ont été construites afin d'étudier les capacités catalytiques des différents complexes du système de transport des électrons (ETS) à quatre températures différentes. L'impact de la température sur la respiration mitochondriale a été évalué dans ces deux haplotypes créés en utilisant des titrations expérimentales (expériences multiples substrats-découpleurs-inhibiteurs). Nous avons examiné les conséquences fonctionnelles des voies métaboliques mitochondriales convergeant à la jonction Q de l'ETS à quatre températures différentes. Nous avons aussi mesuré l'intégrité fonctionnelle de la membrane externe mitochondriale, l'activité de la pyruvate déshydrogénase (PDH), la respiration découplée ainsi que l'excès apparent de cytochrome *c* oxydase (COX) aux mêmes températures lors d'un flux élevé d'électrons dans l'ETS. Nos résultats ont montré que même si les capacités catalytiques de l'ETS ne sont pas affectées par les introgressions, l'impact de la température sur les fonctions mitochondriales est différent entre les deux mitotypes étudiées, principalement au niveau de l'excès apparent de COX. Les mitotypes *sII* et *sIII* sont des populations sympatriques étroitement liées et il semble que seule leur capacité à faire face aux variations de température est affectée par le bris des interactions mitonucléaires.

4.1 Abstract

In this study, we determined the differences in catalytic properties of mitochondria dictated by divergences in mitochondrial DNA haplotypes of two populations of *Drosophila simulans* (*sII* and *sIII*) by using an *in situ* approach on muscle permeabilized fibers. We used four introgressed isofemale lines (*sII*-introgressed) possessing the mtDNA of *sII* and the nuclear background of *sIII* and four maintained lines (*sIII*-controls) possessing *sIII* mitochondrial and nuclear genome to study the catalytic capacities of ETS at four different temperatures. The impact of temperature on mitochondrial respiration was evaluated in these two constructed haplotypes using multiple substrate-uncoupler-inhibitor titration experiments. We investigated the functional consequences of convergent mitochondrial pathways at the Q-junction of the electron transport system (ETS) from three different branches at four different temperatures. We also measured the functional integrity of outer mitochondrial membrane, the pyruvate dehydrogenase (PDH) activity, the uncoupled respiration as well as the excess capacity of complex IV (COX) at the same temperatures during high convergent pathway flux. Our results showed that even if the catalytic properties of the ETS are not affected by introgressions, the impact of temperature on mitochondrial function is divergent between the two mitotypes studied likely through the apparent excess COX capacity. The mitotypes *sII* and *sIII* are closely related sympatric populations and it seems that only their ability to cope with temperature variation is affected by broken mitonuclear interactions.

4.2 Introduction

Mitochondria occupy a central position in our understanding of the cell bioenergetics. The study of mitochondria has, from the very beginning, revealed not only details, but also fundamental insights covering the entire spectrum from biophysics to cell biology and genetics. Since the discovery of mitochondrial DNA (mtDNA), one of the most challenging inquiring about mitochondria concerns the connection between the mitochondrial genotype and the organismal phenotype (Ballard and Melvin, 2010). Historically, bridging the genotype and phenotype has been notoriously difficult mostly because most observed genetic changes on mtDNA do not influence the phenotype (Ballard and Melvin, 2010). Furthermore, single substitution could have notorious impact on mitochondrial function since it can be deleterious, neutral or occasionally advantageous (adaptive) (Wallace, 2007; Clancy, 2008). Therefore, classical statistical test of neutrality on the evolution of mtDNA hardly detect positive selection (bringing to valuable functional improvements) since they are lost among the vast majority of neutral substitutions. In this context, the direct study of functional properties of mitochondria and particularly the electron transport system (ETS) may help us to delineate the relation between genotype and phenotype. Indeed, the complexes of the mitochondrial ETS are encoded by both nuclear and mtDNA. The mtDNA of most animals encodes for 13 peptides involved in oxidative phosphorylation (OXPHOS). Moreover, these complexes are suspected to partly evolve to adjust OXPHOS to environmental conditions of the organism (Das, 2006, Pichaud et al., 2010; Pichaud et al., in press). Since all mtDNA genes are usually transmitted maternally (but see Breton et al., 2007) as one single haplotype, it has been suggested that selection on mtDNA might lead to haplotypes adapted to different environments (Blier et al., 2001; Fontanillas et al., 2005; Pichaud et al., in press).

Among environmental parameters, temperature is likely one of the most significant for ectotherm organisms. Temperature is known to affect most physiological and biochemical process particularly through its impact on enzymes and membrane functions (Hochachka and Somero, 2002). Mitochondria are no

exception and catalytic capacity of whole mitochondria and key enzymes of mitochondrial respiration are strongly affected by environmental temperature variations in ectotherms in general and in *Drosophila* in particular (Blier and Lemieux, 2001; Pichaud et al., 2010; Pichaud et al., in press). For example, the cytochrome *c* oxidase (COX, complex IV) was generally found in excess in isolated mitochondria and this excess compared with the aerobic mitochondrial capacity seems to be a basis for the high oxygen affinity of the mitochondrial respiration (Gnaiger et al., 1998). Thermally induced-changes in COX activity might therefore have little effect on the maximal respiration rate while still acting on regulation of respiration mainly through impact upon the redox state of ETS (Blier and Lemieux, 2001).

By using high electron input in the ETS through multiple substrates, our laboratory showed that the COX excess capacity was lower than expected or even non-existent, depending on the experimental temperature. At low temperature, a threshold, and consequently an apparent COX excess capacity was detected in *Drosophila* using both isolated mitochondria and permeabilized fibers (Pichaud et al., 2010; Pichaud et al., in press). As a consequence, the level of control of mitochondrial respiration by COX should change according to the temperatures tested (Pichaud et al., 2010; Pichaud et al., in submission process). Moreover, the different parts of ETS appear to be differently affected by temperature change (Pichaud et al., 2010; Pichaud et al., in submission process). It suggested that the selection pressure exerted on ETS enzymes could partly be dictated by the thermal environment (especially for ectotherms). It may allow to insure the maintenance of the functional equilibrium among complexes, and leading to changes in both nuclear-encoded and mitochondrial-encoded subunits of ETS complexes (Ellison and Burton, 2006; Wilett and Burton, 2004). Therefore we can suspect that the functional properties of mitochondrial ETS complexes may vary according to the thermal range of organisms and temperature impact on the electron flux, leading to divergences in mtDNA.

Drosophila simulans could be an appropriate model to study functional

specificity of mtDNA because it exhibits three different mitochondrial haplotypes (*sI*, *II* and *III*) with nearly 3% interhaplogroup divergence (Ballard, 2000a; Ballard, 2000b; Ballard, 2005) but lacks any evidence of nuclear subdivision at any nuclear encoded loci tested to date (Katewa and Ballard, 2007; Melvin et al., 2008). The *sII* and *sIII* populations live in sympatry in Kenya where the frequency of the *sIII* mitotype is about 40% (Ballard, 2004). In four wild caught *sII* and four *sIII* fly lines, low amino acid variation was observed within mitotypes in a 4.5 kb region spanning from position 1450 to position 5983 of the mtDNA genome. In contrast large divergences were noticed between the mitotypes ($2.04 \times 10^{-2}\%$ nucleotide divergence, $1.21 \times 10^{-2}\%$ amino acid divergence in the same region) (Ballard et al., 2007). In this context, variations between mitotypes are highly suspected to affect the performances of mitochondria and the overall regulation of mitochondrial respiration through a different control of a particular enzyme of the ETS. To investigate the metabolic characters associated with a given mitochondrial haplotype, the logical way to proceed is to assess the mitochondrial respiration and the electron flux throughout the ETS in populations characterized by divergent haplotypes. In a previous study (Pichaud et al., in press), we used an *in situ* approach to evaluate the mitochondrial respiration of two native mitotypes of *D. simulans* (*sII* and *sIII*) at 12, 18, 24°C (considered as an optimal temperature) and 28°C in permeabilized fibers during high electron input through the ETS using multiple substrate-uncoupler-inhibitor titration (SUIT) protocols (Gnaiger et al., 2005) adapted to *Drosophila*. This protocol allowed scrutinizing on control of OXPHOS capacity, and exploring the functional consequences of convergent mitochondrial pathways at the Q-junction (Gnaiger, 2007). We measured higher catalytic capacities of ETS at 24°C for the *sII* mitotype when compared to the *sIII* mitotype and postulated that this catalytic advantage should be associated to the ability of complexes III and IV to deplete electron. Moreover, we showed that the different thermal sensitivity of the two mitotype's ETS complexes could result from selection on these mitotypes to better perform in their specific environment. However, we could not conclude that the difference resides entirely at the level of mtDNA as hitherto undetected differences in nuclear genes may still exist. Indeed, different components of the ETS should be coadapted to

efficiently fulfill their task (Blier et al., 2001; Rand et al., 2004).

To investigate the potential adaptive value of mtDNA it is therefore necessary to control the potential impact of either nuclear genome or mito-nuclear co-adaptations. For this purpose, mitochondrial introgressions from one mitotype into the nuclear background of a distinct mitotype can be performed. A previous study based on a population cage competition showed that a *D. simulans* strain with micro-injected foreign mitochondria was outcompeted by those that had kept their original haplotype (Nigro, 1994). Also, backcrossing studies have shown to induce significant decrease in fitness and mitochondrial bioenergetic efficiency in introgressed lines of *Drosophila* (James and Ballard, 2003; Sackton et al., 2003) or of *Tigriopus*, a copepod from the family of harpacticidae (Ellison and Burton, 2006). Together, these data suggest that mitotype and mito-nuclear interactions could influence competitive abilities and the mitochondrial metabolism (Hébert Chatelain et al., 2010).

The aim of this study is to investigate the adaptive potential of mtDNA divergences at the four different temperatures already tested (Pichaud et al., in press) using mitochondrial introgression of the two different mitotypes of *D. simulans* (*sII* and *sIII*) with the *in situ* approach. We used four introgressed isofemale lines (*sII*-introgressed) possessing the mtDNA of *sII* and the nuclear background of *sIII* and four maintained lines (*sIII*-controls) possessing *sIII* mitochondrial and nuclear genome to study the catalytic capacities of ETS at four different temperatures. The thermal sensitivity of mitochondrial respiration was measured with different combination substrates of complex I, complex II, complex III through Q pool, and their respective inhibitors. We also determined functional integrity of outer mitochondrial membrane, thermal sensitivity of uncoupled respiration as well as that of the excess capacity of COX at high convergent pathway flux using inhibitor titration experiments in order to compare overall mitochondrial performances at different temperatures of both *sII*-introgressed and *sIII*-controls. Measurements of pyruvate dehydrogenase activity were also performed to investigate the electrons entry in the ETS at the level of complex I. We can predict that if the divergences in mtDNA are adaptive and confer the metabolic differences between the two mitotype

lines, we should observed the same differences on the functional properties of mitochondria in comparing *sII*-introgressed and *sIII*-controls than we did in our previous study with native *sII* and *sIII* lines (Pichaud et al., in press). Indeed, in this previous study we detected higher catalytic capacities of ETS for the *sII* mitotype at 24°C and suggested that this catalytic advantage should be associated to the ability of complexes III and IV to deplete electron (Pichaud et al., in press). On the other hand, if the *sII* and *sIII* mtDNA are coadapted specifically with their corresponding *sII* or *sIII* nuclear DNA, any functional specificity may depend principally on mito-nuclear interactions. In this case, we should detect a disruption of the catalytic capacities of the ETS in *sII*-introgressed mitotypes due to alteration of these interactions. This is to our knowledge one of the first clear empirical test of the potential adaptive value for different thermal regimes of different mitochondrial mitotypes.

4.3 Materials and Methods

4.3.1 Fly lines

Eight native lines of *Drosophila simulans* (STURTEVANT 1919) having *sII* and *sIII* mitotypes both collected in Kenya, were used for experiments. For each mitotypes, four isofemale lines (namely 2KY0412, 2KY0415, 2KY0418 and 2KY0421 for *sII*; 3KY0410, 3KY0412, 3KY0414 and 3KY0420 for *sIII*) were reared from flies collected in Nairobi (Kenya) during November 2004 (Ballard et al., 2007). In order to examine the possible influence of mitotype on mitochondrial metabolism, four introgressed lines (*sII*-introgressed) possessing the mtDNA of *sII* and the nuclear background of *sIII* and four maintained lines (*sIII*-controls) possessing *sIII* mitochondrial and nuclear genome were studied. The *sII*-introgressed lines were constructed by mating 15 *sII* virgin females of the four isofemale lines with 30 *sIII* males of the four isofemale lines. After three days, adult flies were removed from recipients and the virgin female progeny (F_1) of these parents were then backcrossed with *sIII* males (Fig. 4.1).

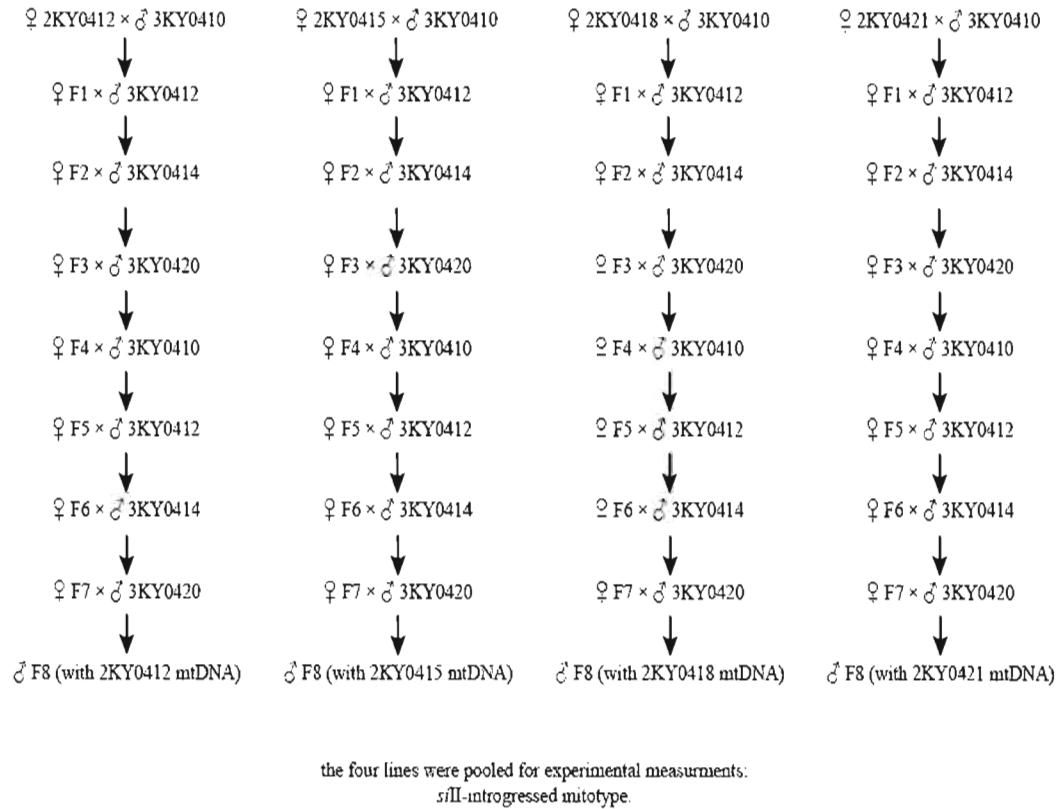


Figure 4.1 Design of introgressions for *sII*-introgressed flies. The four constructed lines were pooled for experimental measurements.

This was repeated until eight generations of backcrossing were complete, and F8 males were collected for experiments. All lines preparations were performed at 24 °C. Because mitochondria are maternally inherited, backcrossing allows maintenance of maternal mtDNA while increasing the proportion of paternal nuclear DNA. Theoretically, this procedure allows a replacement of more than 99.6 % of nuclear DNA to obtain *sII* mtDNA with *sIII* nuclear DNA (but see Dermitzakis et al., 2000). The *sIII*-control lines were developed by using the same procedure with *sIII* females of the four isofemale lines and *sIII* males of the four isofemale lines. The constructions of the *sIII*-controls lines allow decreasing a possible inbreeding effect and serving as controls for the comparison with disrupted genotypes. Flies from the

four introgressed lines as well as the four control lines were pooled before experience measurements. According to Ballard et al. (2007), there is only one nonsynonymous change within *sll* lines and one nonsynonymous change within *slll* lines over 5500 bp of mtDNA analysed. In contrast large divergences were noticed between the mitotypes ($2.04 \times 10^{-2}\%$ nucleotide divergence, $1.21 \times 10^{-2}\%$ amino acid divergence in the same region). At the beginning and at the end of the study, the mtDNA type of each line was determined using allele-specific PCR (Dean et al., 2003) and the absence of *Wolbachia* was verified using conserved 16S rDNA primers (James and Ballard, 2000).

Flies were reared in standard cornmeal medium containing a mixture of 10 g of agar-agar, 12 g of sugar, 54 g of dried yeast and 106 g of cornmeal flour dissolved in 2 l of tap water. Propionic acid (8 ml) and methyl-4-hydroxybenzoate 10% (w/v) in ethanol (32 ml) were added to the mixture to avoid mite and mould contamination. All *Drosophila* used for experiments were 10-days-old males (the large number of mitochondria in female abdominal oocytes may bias experiment measurements). To avoid fitness problems associated to aging, each line was started with flies less than 14-days-old. Each population was reared in two different incubators (A and B) to allow replicates of experimental lines and to avoid any “incubator” effect.

4.3.2 Preparation of permeabilized muscle fibers

All steps were done at 4°C and the procedure for fibers permeabilization was done as previously described (Pichaud et al., in press). Briefly, for each preparation, flight muscles from 4 thoraxes of 10-days-old *D. simulans* were taken. Thoraxes were separated from abdomens and heads and then placed onto a Petri dish with 2 ml of relaxing solution (BIOPS, Veksler et al., 1987; Letellier et al., 1992) containing 2.77 mM CaK₂EGTA, 7.23 mM K₂EGTA, 5.77 mM Na₂ATP, 6.56 mM MgCl₂, 20 mM Taurine, 15 mM Na₂Phosphocreatine, 20 mM Imidazole, 0.5 mM Dithiothreitol, 50 mM K-MES, pH 7.1. Individual fiber bundles were separated with two pairs of sharp forceps, achieving thin muscle-fibers bundles. The fibers bundles were transferred to

a Petri dish containing 2 ml of BIOPS and $81.25 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ saponin and were gently mixed at 4°C for 30 minutes. Fibers bundles were then rinsed at 4°C for 10 minutes in respiration medium containing 120 mM KCl, 5 mM KH_2PO_4 , 3 mM Hepes, 1 mM EGTA, 1 mM MgCl_2 and 0.2% BSA (w/v), pH 7.2 and immediately transferred into a respirometer (Oxygraph-2k, Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria) filled with air-saturated respiration medium. The oxygen electrodes were calibrated with air-saturated respiration medium at each experimental temperature, and zero oxygen measurements were taken after sodium dithionite addition. O_2 solubility for medium respiration was calculated for the four experimental temperatures according to Rasmussen and Rasmussen (2003).

4.3.3 High-resolution respirometry

4.3.3.1 O_2 fluxes measurements with substrates and uncoupler

Respiration was measured at 12, 18, 24 and 28°C and data acquisition and analysis measured using the software DatLab (Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria). According to the temperature and the mitotype tested, mitochondrial respiration of 6 to 12 different preparations were averaged for each incubator (12 and 8 preparations for *sII*-introgressed and *sIII*-controls respectively at 12°C ; 10 and 8 preparations for *sII*-introgressed and *sIII*-controls respectively at 18°C ; 8 and 6 preparations for *sII*-introgressed and *sIII*-controls respectively at 24°C ; 7 and 9 preparations for *sII*-introgressed and *sIII*-controls respectively at 28°C). After addition of pyruvate (10 mM), malate (10 mM), and L-proline (10 mM), fibers bundles were transferred into the respiration chambers to achieve state 2. The following substrates or uncoupler were then sequentially added to the chamber: ADP (5 mM, to achieve state 3 respiration for complex I, CI), cytochrome *c* from equine heart (10 μM , as an index of functional integrity of the outer mitochondrial membrane, Clc), succinate (10 mM, to reach state 3 respiration for complex I + complex II, Clc+CII), *sn* glycerol-3-phosphate (20 mM, to achieve state 3 respiration for complex I + complex II + glycerol-3-phosphate dehydrogenase, Clc+CII+G3Pdh) and 2,4-dinitrophenol

(uncoupler, optimum concentration between 5 to 15 μM to reach maximum O_2 flux, Clc+CII+G3Pdh+u). According to Gnaiger (2009), this protocol allowed us to calculate RCR for complex I (CI/state 2), Cytochrome *c* effect (Clc/CI), Uncoupling Control Ratio (UCR, $\text{Clc+CII+G3Pdh+u/Clc+CII+G3Pdh}$), O_2 flux (for CI , Clc , Clc+CII , Clc+CII+G3Pdh and Clc+CII+G3Pdh+u), and Substrate Control Ratios (SCR, ratios of fluxes in the same coupling state for Clc and Clc+CII with Clc+CII+G3Pdh as the reference state). From this point, studies were conducted in two different ways: (1) inhibitors were sequentially introduced to inhibit the overall mitochondrial respiration, and complex IV (COX) activity was determined using TMPD and ascorbate before sodium azide titration was performed and (2) mitochondrial respiration inhibition was measured using sodium azide titration. At 24°C , some problems with the instrument occurred and consequently data for the different azide titrations and for the metabolic control calculation were discarded for this specific temperature.

4.3.3.2 Inhibitors and COX activity

After mitochondria were uncoupled, the following inhibitors and substrates were introduced in the following order: rotenone (0.5 μM , inhibitor of complex I, CII+G3Pdh+u), malonate (5 mM, inhibitor of complex II, G3Pdh+u), antimycin A (2.5 μM , inhibitor of complex III, Rox (residual oxygen consumption, reached after simultaneous inhibition of complexes I, II and III)), TMPD + ascorbate (0.5 mM and 2 mM respectively, to measure complex IV activity, COX). After each introduction, oxygen consumption was measured and chemical backgrounds (oxidation rates due to autoxidation of TMPD, ascorbate and cytochrome *c*) as well as instrumental backgrounds were subtracted from the activity (Gnaiger and Kuznetsov, 2002). These subtractions allowed us to calculate O_2 flux (for CII+G3Pdh+u , for G3Pdh+u , for Rox and for COX) and SCR (for CII+G3Pdh+u and for G3Pdh+u with Clc+CII+G3Pdh+u as the reference state).

4.3.3.3 Azide titration experiment

After TMPD + ascorbate were introduced (1), sodium azide was progressively

added at appropriate intervals to inhibit COX activity. The concentrations used for titration were the following: 1, 2, 7, 12, 32, 52, 102, 152, 252, 352, 852, 1352, 3852 and 8852 μM or until maximum inhibition was achieved. Alternatively, after mitochondria were uncoupled, the same sodium azide titration was performed (2) to progressively inhibit the maximum pathway flux. This titration of maximum pathway flux as well as azide titration of COX activity allowed us to construct plots of relative respiration rate against the percentage of inhibition of COX activity at the same azide concentration (Letellier et al., 1994; Villani and Attardi, 1997). The inhibition constant (K_i) was calculated from transformed data using the Dickson linearization (Kuznetsov et al., 1996). As azide is a non-competitive inhibitor, the flux control coefficient (C_i) was calculated using the following equation:

$$C_i = -(dJ/J)/(dI/K_i),$$

where J is the respiration flux, dJ is the decrement of respiration flux caused by increment of inhibitor addition dI (between 0 and 50 μM) and K_i is the inhibition constant for sodium azide (Kuznetsov et al., 1996).

Measurements of mitochondrial respiration were averaged for each mitotype (*sII*-introgressed and *sII*-controls) at each temperature (12, 18, 24 and 28°C) and for each incubator (A and B). Data were expressed as means of respiration rate expressed in pmol of oxygen consumed per second per mg proteins for each mitotype at each temperature and for each incubator.

4.3.4 Enzymatic analyses

PDH activity was measured using a UV/VIS spectrophotometer (Perkin Elmer, Lambda 11, Foster City, CA. USA) equipped with a thermostated cell holder and a circulating water bath. PDH was measured from 16 whole flies (4 from each isofemale line of each mitotype) homogenized in 1600 μl of ice-cold buffer containing 50 mM Tris-HCl, 1mM MgCl_2 , 0.1% Triton X-100, 1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ BSA, pH 7.8 and

centrifuged 3 minutes at 750 g. Each measurement was done in duplicate, and for each incubator, at each temperature and for each mitotype, five different analyses were averaged. Enzymatic activities were expressed in $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteins, where U is 1 μmol of substrate transformed per minute.

PDH activity was measured according to Thibeault et al. (1997). NADH production was followed by coupling it to the reduction of iodotetrazolium violet (INT). Briefly, 100 μl of the supernatant were incubated with ice-cold buffer supplemented with 2.5 mM NAD, 0.5 mM EDTA, 0.1 mM coenzyme A, 0.1 mM oxalic acid, 0.6 mM INT, 6 $\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$ lipoamide dehydrogenase, 0.2 mM thiamine pyrophosphate, pH 7.8. The reaction was initiated with the addition of 5 mM pyruvate (omitted from the control) and the change in absorbance was read for 5 minutes at 500 nm ($\text{INT} \epsilon_{500} = 15.4 \text{ ml} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \mu\text{mol}^{-1}$).

4.3.5 Protein content

At the end of each mitochondrial respiration measurements, fibers bundles were removed and homogenized with a Tekmar homogenizer and the subsequent homogenates were immediately frozen at -80°C for further analyses. Total protein content was determined both for homogenates from fiber bundles and from whole flies in duplicate by the bicinchoninic acid method (Smith et al., 1985). Due to addition of cytochrome c during experiments as well as the presence of BSA in the ice-cold buffer and in the respiration medium, the protein content of the buffer was subtracted from the fibers preparations.

4.3.6 Temperature coefficient values

Temperature coefficient (Q_{10}) values for mitochondrial functions (CI, Clc, Clc+CII, Clc+CII+G3Pdh, Clc+CII+G3Pdh+u, CII+G3Pdh+u, G3Pdh+u and COX activity) were calculated using the following formula:

$$Q_{10} = (\text{Rate 2} / \text{Rate 1})^{10/(t_2-t_1)}$$

where Rate 1 is for the mean rate of the parameter measured at the temperature t_1 , and Rate 2 is the mean rate of the parameter measured at the temperature t_2 . As the different parameters were not measured on the same individuals, Q_{10} were calculated using the mean of each parameter measured at each temperature.

4.3.7 Chemicals

All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (Mississauga, ON, Canada).

4.3.8 Statistical analyses

All statistical analyses were performed with SAS software (9.1.3, SAS Institute, Cary, IN, USA). O'Brien's test was used to verify homogeneity of data. Analyses of variance (ANOVA) with three independent variables (temperature, mitotype, incubator) were performed using a general linear model (GLM) procedure with the least square means method for multiple comparisons tests. This allowed us to determine any interactions between the variables, and the effect of each variable on the different parameters measured. Significance was defined at $P < 0.05$.

4.4 Results

No incubator effect was detected for any of the parameters measured and consequently, data from incubators A and B were pooled for multiple comparisons, giving 12 to 24 different preparations according to the temperature and the mitotype tested (24 and 16 preparations for *sIII*-introgressed and *sIII*-controls respectively at 12°C; 19 and 15 preparations at 18°C; 15 and 12 preparations at 24°C; 14 and 17

preparations at 28°C) and 10 different homogenates for enzymatic analyses for each group at each temperature. Analyses of variance results for F ratios and P are presented for the factors “temperature”, “incubator”, “mitotype” and their interaction.

For oxygen fluxes and consequent RCR, UCR and SCR, Rox was subtracted from initial oxygen fluxes measured.

4.4.1 Fly weight

The mass of flies was not influenced by the mitotype ($F_{1, 556}=2.8$, $P = 0.09$), by the incubator ($F_{1, 556}=1.35$, $P=0.25$) or by the interaction mitotype*incubator ($F_{1, 556}=0.09$, $P=0.76$). Every line from each of the two groups (*sII*-introgressed and *sIII*-controls) were pooled together to decrease the inbreeding effect. The resulting pools were not different for means mass between mitotypes or between incubators (0.667 ± 0.099 mg for *sII*-introgressed incubator A; 0.655 ± 0.081 mg for *sII*-introgressed incubator B; 0.652 ± 0.086 mg for *sIII*-controls incubator A; 0.646 ± 0.079 mg for *sIII*-controls incubator B).

4.4.2 Respiratory Control Ratios

RCRs were used as an index of functional integrity of mitochondria and were presented in Fig. 4.2. Nested ANOVA showed that none of the variables (mitotype, incubator or temperature) neither their interactions influenced the RCR. Only differences between temperatures were detected with the Least Square Means method for both groups. In *sII*-introgressed, RCRs were significantly lower at 12°C when compared with 24°C ($P = 0.0358$) whereas in *sIII*-controls only RCRs measured at 24°C were significantly higher than at 28°C ($P = 0.0250$).

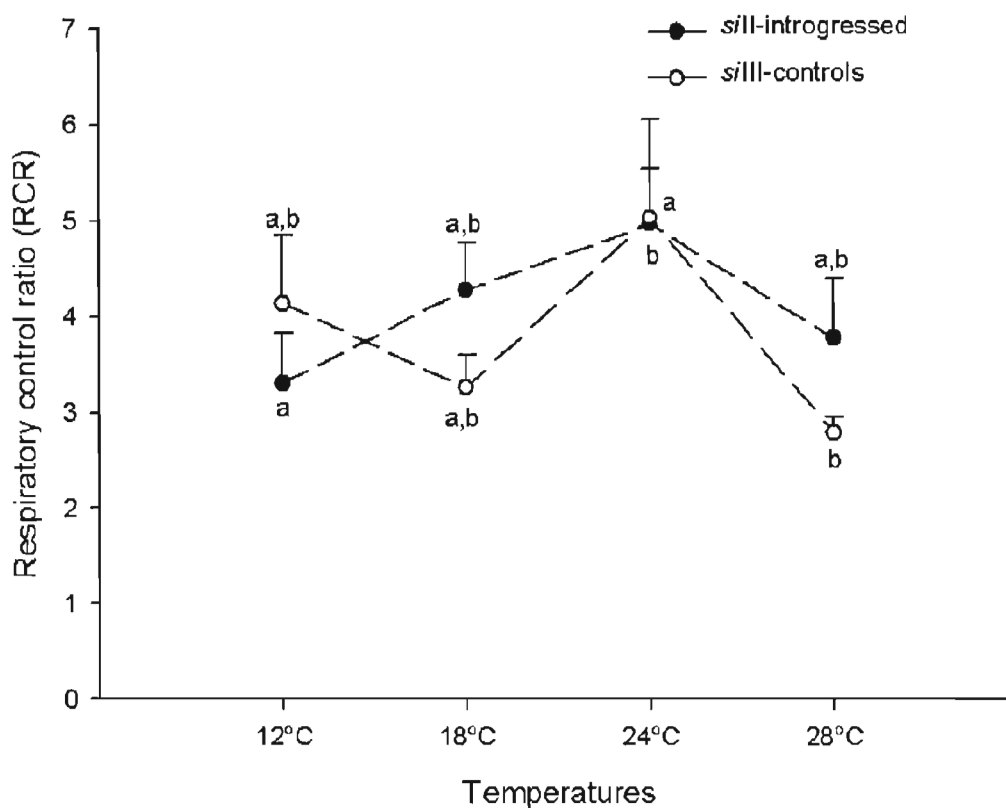


Figure 4.2 Effect of temperature on Respiratory Control Ratio (RCR = CI/state2) when fibers preparations from the two haplotypes, *sII*-introgressed and *sIII*-controls, were supplied with pyruvate+malate+L-proline (state2) +ADP (CI) at the complex I level. Results are means \pm SE for 12 to 24 fibers preparations. Significance was set as $P < 0.05$; letters denote differences between temperatures with a statistically different from b.

4.4.3 Cytochrome *c* effect and Uncoupling Control Ratio

To assess mitochondrial integrity, O_2 flux was compared before and after cytochrome *c* injection. Consistent with prediction, ratios of CIc/CI showed little effects of cytochrome *c* addition on the mitochondrial respiration (CIc/CI ratios were not significantly different from 1, results not shown), denoting functional integrity of outer and inner mitochondrial membrane.

O₂ flux was compared before and after the addition of an uncoupler to see if the ATPase exerted a limitation on the mitochondrial respiration. As already shown in a previous study (Pichaud et al., in submission process), all UCRs were close to 1 (results not shown) denoting that ATP synthesis capacity (ATP synthase) can support the maximum respiration rates induced by experimental substrates.

4.4.4 Respiration rates

All parameters for the O₂ fluxes measured at the different steps of the ETS (Fig. 4.3; CI, Clc, Clc+CII, Clc+CII+G3Pdh, Clc+CII+G3Pdh+u, CII+G3Pdh+u, G3Pdh+u and COX) were strongly influenced by temperature ($F_{3, 50}=16.27$, $F_{3, 50}=14.75$, $F_{3, 50}=29.61$, $F_{3, 50}=35.6$, $F_{3, 50}=32.96$, $F_{3, 50}=29.22$, $F_{3, 50}=28.86$ and $F_{3, 50}=53.16$ respectively, all P -values<0.0001). Moreover, Clc+CII, Clc+CII+G3Pdh, Clc+CII+G3Pdh+u and CII+G3Pdh+u were also influenced by the mitotype ($F_{1, 50}=5.48$, $P=0.023$; $F_{1, 50}=8.5$, $P=0.006$; $F_{1, 50}=10.56$, $P=0.002$; $F_{1, 50}=11.7$, $P=0.001$ respectively) and the interaction mitotype*temperature ($F_{3, 50}=3.19$, $P=0.032$; $F_{3, 50}=3.35$, $P=0.026$; $F_{3, 50}=3.18$, $P=0.032$; $F_{3, 50}=2.89$, $P=0.045$ respectively) whereas G3Pdh+u was only influenced by the mitotype ($F_{1, 50}=12.24$, $P=0.001$). No significant differences were detected with multiple comparisons between incubators for all the parameters measured. At 24°C, differences between mitotypes were detected for Clc+CII, Clc+CII+G3Pdh and Clc+CII+G3Pdh+u ($P=0.037$, $P=0.04$ and $P=0.034$ respectively), with *sII*-introgressed having higher oxygen consumption than *sIII*-controls. These results are consistent with a previous study on native *sII* and *sIII* mitotypes (Pichaud et al., in press) except for COX which did not show any significant differences (but a pattern also in line with our previous study).

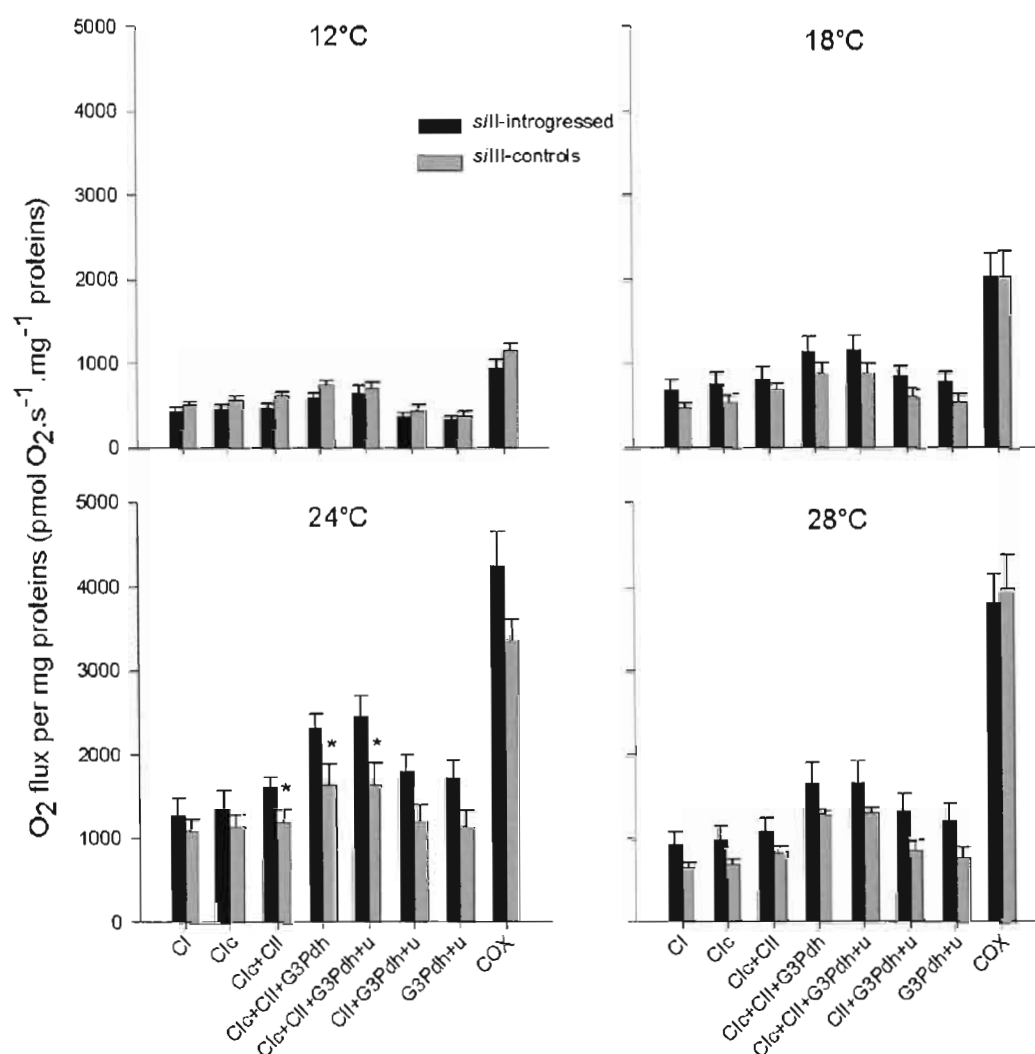


Figure 4.3 Mitochondrial functions measured at four different temperatures in permeabilized fibers from the two haplotypes of *Drosophila simulans* *sIII*-introgressed and *sIII*-controls. O₂ fluxes are expressed as pmol O₂ consumed per second per mg proteins with pyruvate+malate+L-proline+ADP (CI), + cytochrome *c* (Clc), +succinate (Clc+ClI), +*sn* glycerol-3-phosphate (Clc+ClI+G3Pdh), +2,4-dinitrophenol (Clc+ClI+G3Pdh+u), +rotenone (ClI+G3Pdh+u), +malonate (G3Pdh+u), +antimycin A (Rox) +TMPD+ascorbate (COX) and were corrected for Rox. Results are means \pm SE for 6 to 12 fibers preparations. Significance was set as $P < 0.05$; * denotes differences between haplotypes.

4.4.5 Substrate Control Ratio (SCR)

SCR allowed us to determine the effect of each substrate addition on the mitochondrial respiration. For Clc and Clc+CII, the reference state was chosen as Clc+CII+G3Pdh while for CII+G3Pdh+u and G3Pdh+u, the reference state was taken as Clc+CII+G3Pdh+u. All SCRs were only influenced by temperature ($F_{3, 110}=8.98$, $P<0.0001$; $F_{3, 110}=17.89$, $P<0.0001$; $F_{3, 48}=7.48$, $P=0.0003$; $F_{3, 48}=8.92$, $P<0.0001$ for Clc, Clc+CII, CII+G3Pdh+u and G3Pdh+u respectively) and no significant differences between mitotypes were detected with multiple comparisons (results not shown).

4.4.6 Cytochrome c oxidase excess capacity and flux control coefficient

Apparent excess capacity of COX at high flux through the ETS was investigated using a combination of substrates that maximally reduces complexes I and II and G3Pdh. Azide titration resulted in hyperbolic inhibition of COX. Threshold plots display overall flux as a function of COX activity; the threshold for inhibition of COX is defined as the intercept of the initial slope with the linear fit of the final slope (Fig. 4.4A). The apparent excess capacity of COX is the intercept of the extrapolation of the linear regression for the final slope with the axis at zero COX inhibition. No excess capacity was detected at either 18 or 28°C (results for 24°C were not considered due to missing data), both mitotypes having approximately the same slope (-0.9989 and -0.9966 for *sII*-introgressed and *sIII*-controls respectively at 18°C; -0.9941 and -0.9899 for *sII*-introgressed and *sIII*-controls respectively at 28°C). At 12°C a threshold, and consequently a COX excess capacity was detected for *sIII*-controls (193%, $R^2=0.993$) which is consistent with our previous study (Pichaud et al., in press). However, no excess capacity was measured for *sII*-introgressed at the same temperature which is quite intriguing since a threshold of 188% was detected in native *sII* mitotype (Pichaud et al., in press).

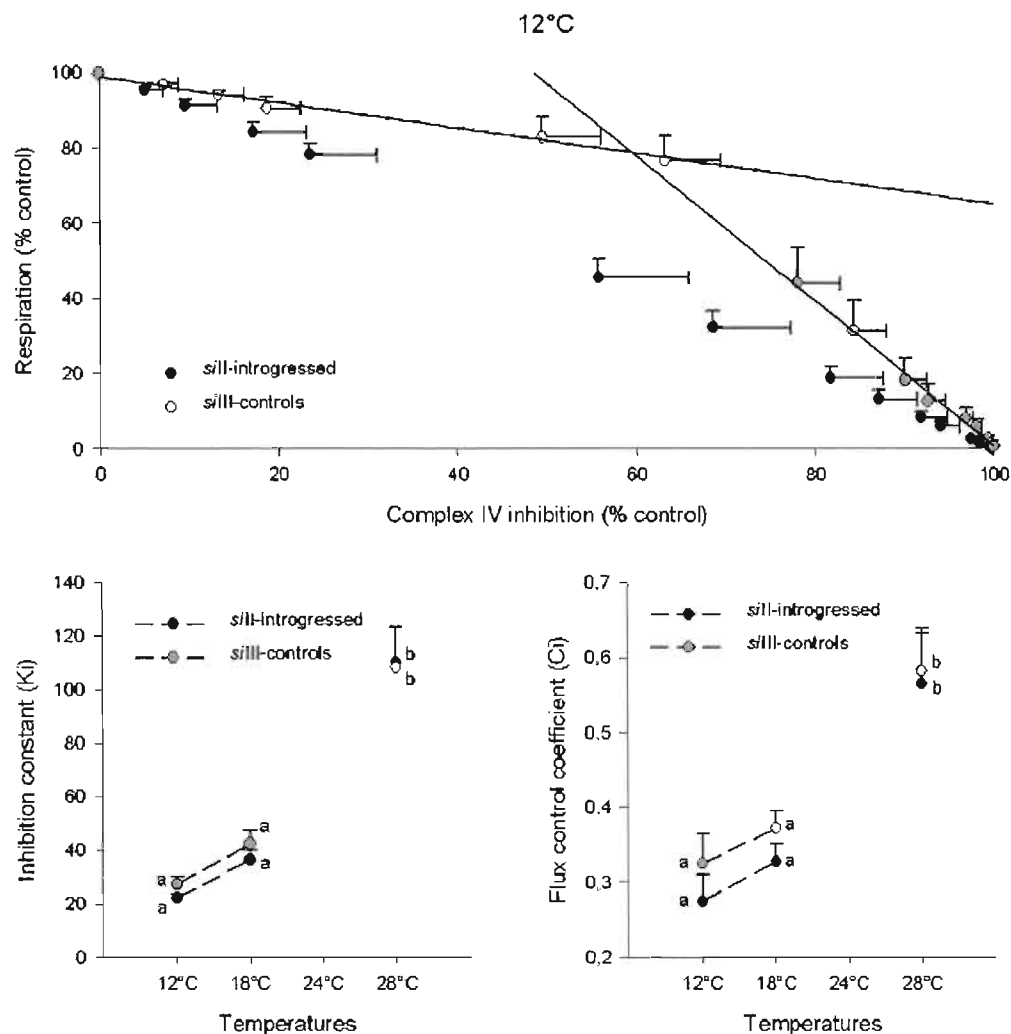


Figure 4.4 (A) Apparent COX excess capacity measured at 12°C in two haplotypes studied, *sII*-introgressed and *sIII*-controls. The COX excess capacity is represented by the threshold plot, which shows the relative flux through the ETS as a function of relative inhibition of COX at similar azide concentrations. Two linear regressions were calculated from initial and final slopes, and extrapolated to zero COX inhibition (*sII*-introgressed, $R^2=0.965$ and $R^2=0.993$ respectively). The intercepts are the COX excess capacity (see text below). Results are means \pm SD. (B) Values of inhibition constant (K_i) of sodium azide calculated from transformed data using the Dickson linearization and (C) values of flux control coefficient (C_i) calculated according to the following formula: $C_i = -(dJ/J)/(dI/K_i)$ in the *sII*-introgressed and *sIII*-controls haplotypes at the four different temperatures. Results are means \pm SE for 6 to 12 fibers preparations for mitochondrial respiration inhibition and for 6 to 12 fibers preparations for COX activity inhibition. Significance was set as $P < 0.05$; letters denote differences between temperatures with a statistically different from b.

In terms of control over the mitochondrial respiration, K_i and C_i were both only influenced only by temperature ($F_{3,49}=46.51$, $P<0.0001$; $F_{3,49}=21.75$, $P<0.0001$ for K_i and C_i respectively). As expected, a slight increase was observed with multiple comparisons both for K_i and C_i with increasing temperatures (Fig. 4.4B and 4.4C), with K_i and C_i significantly higher at 28°C when compared with 12°C (P -values <0.0001 and P -values $=0.0001$ respectively for K_i and C_i for both *sII*-introgressed and *sIII*-controls) and with 18°C ($P<0.0001$ and $P=0.0005$ respectively for K_i and C_i for *sII*-introgressed; $P<0.0001$ and $P=0.001$ for K_i and C_i respectively for *sIII*-controls). However, no significant differences were detected between mitotypes both for K_i and C_i .

4.4.7 Effects of temperature

Q_{10} values were calculated with the mean of each parameter measured at a specific temperature and results are presented in Fig. 4.5. For both mitotypes, Q_{10} of ETS complexes appear to be lower in the higher range and the higher Q_{10} are reached in the range of 12 to 18°C for *sII*-introgressed and 18 to 24°C for *sIII*-controls. However, all Q_{10} are highly elevated for these two temperature ranges and results may only be interpreted except in terms of patterns between mitotypes. The most striking difference between mitotypes is in the range of 12 to 18°C where *sII*-introgressed have 2 to 3 fold higher Q_{10} than *sIII*-controls for all the respiration rates measured. It may suggest that ETS of *sII*-introgressed organisms are more sensitive to low temperatures, which is in line with results on apparent COX excess capacity. Q_{10} values for dehydrogenases are really similar to that we have measured in *sII* and *sIII* native strain (Pichaud et al., in press) and showed that Q_{10} values are higher at higher temperatures with no distinctions between mitotypes.

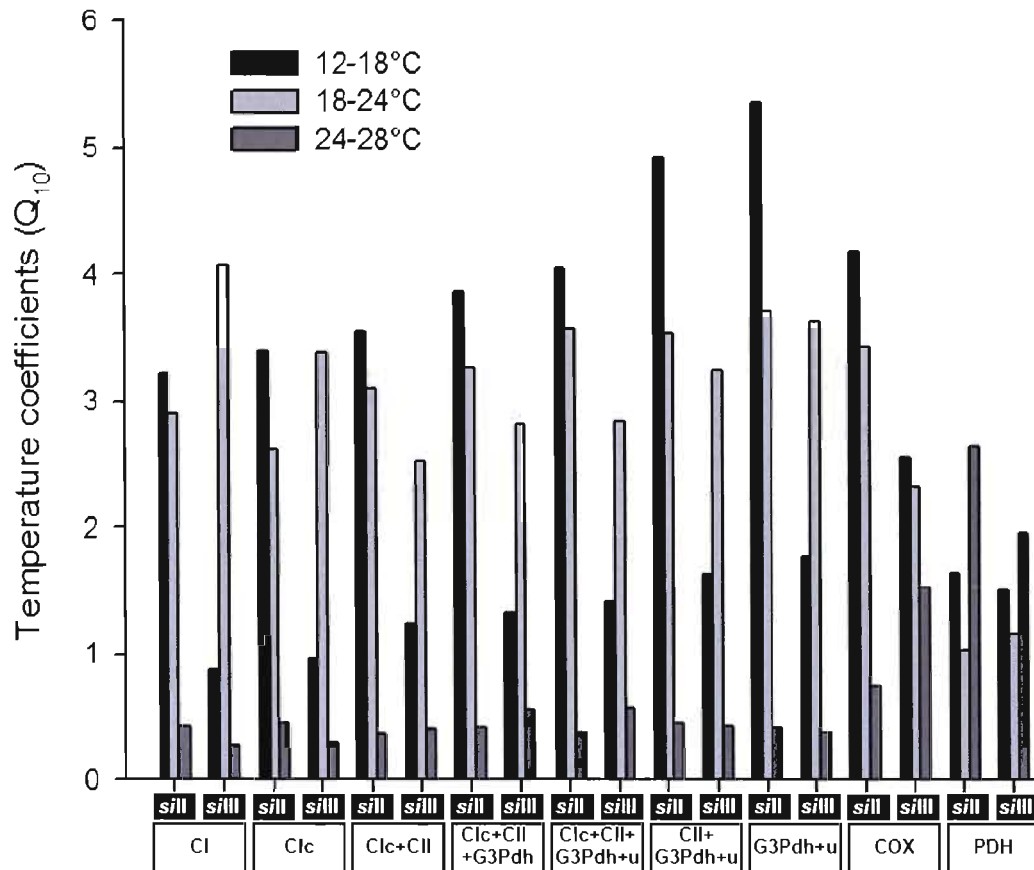


Figure 4.5 Temperature coefficients (Q_{10}) for mitochondrial respiratory fluxes with pyruvate+malate+L-proline+ADP (CI), + cytochrome *c* (Clc), +succinate (Clc+CII), +sn glycerol-3-phosphate (Clc+CII+G3Pdh), +2,4-dinitrophenol (Clc+CII+G3Pdh+u), +rotenone (CII+G3Pdh+u), +malonate (G3Pdh+u), +antimycin A (Rox) +TMPD+ascorbate (COX) and were corrected for Rox, and for pyruvate dehydrogenase (PDH) activity. Q_{10} values for mitochondrial functions were calculated according to the following formula: $Q_{10} = (\text{Rate}_2 / \text{Rate}_1)^{10 / (t_2 - t_1)}$. Results are means for 6 to 12 fibers preparations.

4.4.8 Enzymatic analyses

PDH activities were measured to assess the entry of the electrons into the ETS and results are presented in Fig. 4.6. As expected, PDH activity was influenced by the temperature ($F_{3, 99} = 77.6$, $P < 0.0001$) with almost a two fold increase from 12 to

28°C. Significant differences were also detected between mitotypes ($F_{1, 99}=25.39$, $P<0.0001$), with *sII*-introgressed having higher activities than *sIII*-controls at all the temperature tested (P between 0.008 and 0.03).

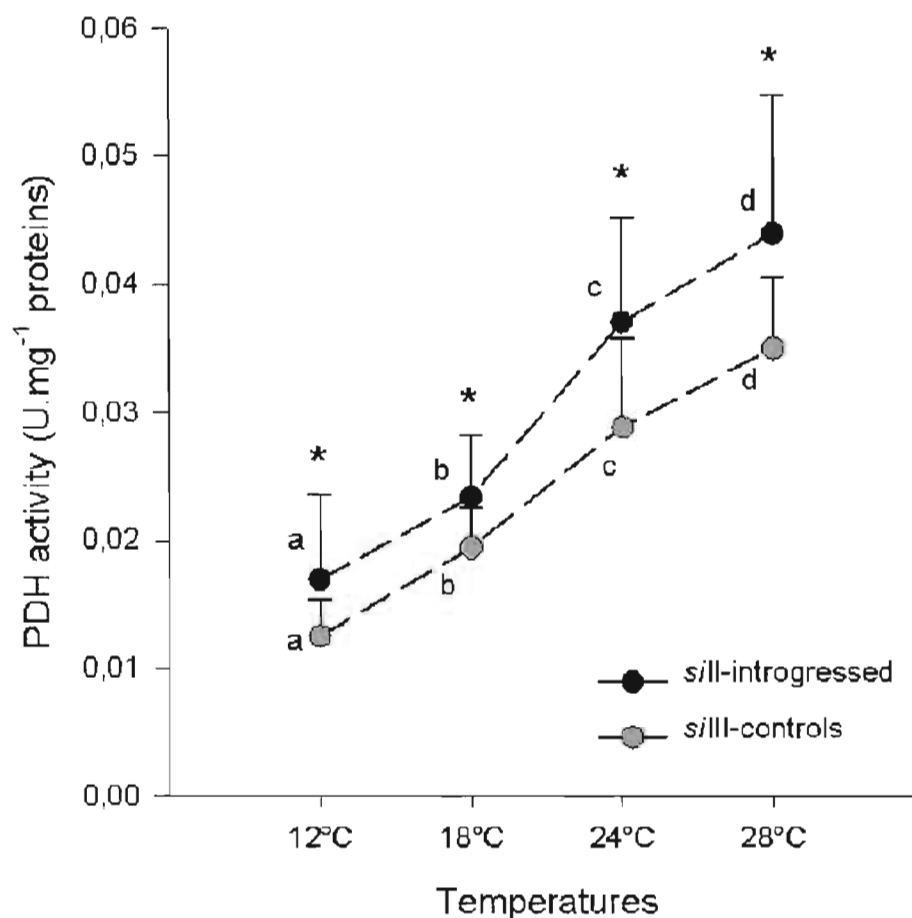


Figure 4.6 Mean (\pm SD) of PDH activities of *Drosophila simulans* haplotypes *sII*-introgressed and *sIII*-controls measured in 10 different homogenates per haplotype per temperature. Significance was set as $P<0.05$; * denotes differences between haplotypes; letters denote differences between temperatures with a statistically different from b, c and d, b statistically different from c and d, c statistically different from d.

4.5 Discussion

The aim of this study was to investigate divergences in mitochondrial functions associated to mtDNA using mitochondrial introgression of two different mitotypes of *D. simulans*. Mitochondrial performances and thermal sensitivity were compared between different backcrossing of *D. simulans* harboring different mitochondrial haplotypes but the same nuclear background. Given the close association between nuclear-encoded and mitochondrial-encoded proteins in the complexes of the ETS and their importance for energy production, co-adaptation between nuclear-encoded and mitochondrial-encoded proteins has been strongly selected during the evolutionary history of these complexes (Willett and Burton, 2004). One hypothesis that may explain intergenomic co-adaptation is selection pressure dictated by environmental impact on functional properties of ETS enzymes (see Willet and Burton, 2004; Ellison and Burton, 2006). It is therefore essential to investigate the thermal sensitivity of the different complexes of the ETS in terms of catalytic capacities to delineate the relation between nuclear and mitochondrial genomes considering that adaptive value may depend on mitochondrial-encoded genes, nuclear-encoded genes that produce structural proteins imported into the mitochondrion, or even mtDNA-nuclear interactions.

In our study, experimental and control backcrosses were performed between 4 different isofemale lines that exhibit the same mtDNA allowing controls and decreasing the possibility of an inbreeding effect (*sIII*-controls), and between 4 isofemale lines from the *sII* mitotype and 4 isofemale lines from the *sIII* mitotype allowing disrupted genotypes (*sII*-introgressed). Theoretically, the maternal inheritance of mtDNA allows transferring the mitochondrial genome of the *sII* mitotype onto more than 99.6% of the *sIII* nuclear background after 8 generations of backcrossing. One important drawback of this method is that comparing mitochondrial functions in terms of O₂ consumption imply the isolation of intact mitochondria using a high number of *Drosophila* (Pichaud et al., 2010) which may be problematic considering the introgression process. An alternate method to compare the different steps of the ETS is to use the *in situ* approach (on permeabilized fibers)

close to the physiological conditions, which allows acute investigation of O_2 consumption even with little amount of tissue (Pichaud et al., in press). To our knowledge, this is the first study addressing the effect of temperature on the different complexes of the ETS using permeabilized fibers of *Drosophila* introgressed with a foreign (but closely related) mitochondrial genome and the second on permabilized fibers of any invertebrate.

The respiratory control ratios showed well-coupled respiration (2.79 to 5.03 according to the temperature and the mitotype) with no significant differences between control and introgressed organisms. The *sIII*-controls showed different RCRs between 24 and 28°C whereas the *sII*-introgressed presented differences in RCRs between 12 and 24°C denoting divergences in the impact of the temperature with disrupted genotypes having the lower RCR at 12°C, and the control genotypes having the lower RCR at 28°C. The cytochrome *c* effect was very low at any experimental temperature, confirming functional integrity of the outer and inner mitochondrial membranes. Moreover, results for UCRs showed that no effect of uncoupling can be detected in *sII*-introgressed and in *sIII*-controls and that when the ETS is “nearly saturated” with electrons from the three branches (CI, CII and G3Pdh) ATP synthesis capacity can support the maximum electron flux through ETS, as already demonstrated in a previous study (Pichaud et al., in press). This result suggests that the phosphorylation of ADP does not appear to be a limiting step and that the control of mitochondrial respiration may be exerted mostly upstream of ATP synthase.

Backcrossing has been used to study mito-nuclear co-adaptation in the marine copepod *Tigriopus californicus* among different geographically isolated populations (Willett and Burton, 2001; Rawson and Burton, 2002; Willett and Burton, 2004; Ellison and Burton, 2006; Ellison and Burton, 2007; Ellison and Burton, 2008). Results from these back-crossing approaches suggest that hybridization disrupts co-adapted nuclear-mitochondrial gene complexes evolving within the study populations. Particularly, in a subset of interpopulation crosses, mitonuclear hybrids created by repeated backcrossing exhibited COX activity levels consistent with

mitochondrial-nuclear co-adaptation (Edmans and Burton, 1998). Moreover, Ellison and Burton (2006) also showed that mitonuclear mismatch reduced activity of complexes I and III, as well as ATP production in hybrids between allopatric populations. In our study, significant differences in O₂ fluxes were detected at 24°C between introgressed and control organisms, with *sII*-introgressed having higher catalytic capacities for Clc+CII, Clc+CII+G3Pdh and Clc+CII+G3Pdh+u than *sIII*-controls, and CII+G3Pdh+u and G3Pdh+u were also influenced by the mitotype as seen with the GLM procedure. In a previous study on native *sII* and *sIII* mitotypes, we detected similar differences at the same temperature for Clc+CII+G3Pdh, Clc+CII+G3Pdh+u, CII+G3Pdh+u, G3Pdh+u and COX (Pichaud et al., in press), *sII* having higher catalytic capacities than *sIII*. These results suggest that differences between introgressed and controls are driven by mtDNA and that there is no disruption for the catalytic capacities as well as for the substrate oxidation efficiency of the different complexes of the ETS according to the nuclear background. *sII* and *sIII* isofemale lines used for this study were from Kenya where they are closely related sympatric populations. It is quite possible that gene flux between these populations prevent establishment of local adaptations at nuclear levels as well as specific mito-nuclear co-adaptation associated to mitotypes. However, selection could act differently on the two mitochondrial genomes leading to particular metabolic phenotype associated to each mtDNA mitotype. Moreover, a limitation of the backcrossing strategy is that mito-nuclear interactions may influence the randomness of the introgressions: Dermitzakis et al. (2000) using introgressions between *D. sechellia* males and *D. simulans* females found that some parts of the *D. sechellia* genome were never detected in the F1 hybrids. This could be the case in our study: even if the two mitotypes are closely related, it is still possible that some part of one genome was never introgressed in the other which could be attributed to incompatibilities of epistatic genes essential for the maintain of the different complexes of the ETS.

A quite intriguing result is the O₂ fluxes measured for COX. Sackton et al. (2003) using experimental and control backcrosses to create disrupted and reconstituted

cytonuclear genotypes within the *D. simulans* clade showed that the COX activities of cytonuclear genotypes carrying disrupted pairs of nuclear and mtDNAs were consistently lower than for control genotypes carrying native nuclear and mitochondrial genomes. Hébert Chatelain et al. (2010), using introgressions between two native lines having *s1I* and *s1II* mitotypes (2KY0421 and 3KY0420), also suggested that differences in COX catalytic capacities detected between introgressed and native mitotypes may be explained by a disruption of the co-adapted genomes in the introgressed population. It is not the case in our study, as we didn't denote any disruption in the catalytic capacities of COX or of other complexes of the ETS. However, we measured COX catalytic capacities in terms of O₂ consumption in permeabilized fibers of flight muscles whereas other studies used homogenates of whole flies. As pointed out by Sackton et al. (2003), COX assays in whole-fly homogenates must depend upon density of COX enzyme in the inner mitochondrial membrane, the total surface area of the inner membrane, and the density of mitochondria per unit protein suggesting that many other nuclear-encoded genes may affect COX activity without affecting the key catalytic residues within a protein. Therefore, it is possible that nuclear genome may affect the complex IV without affecting the catalytic properties of the enzyme in terms of O₂ consumption.

Complex IV is the final complex of the ETS, and it is hypothesized to be a rate-limiting step of mitochondria bioenergetics (Villani et al., 1998). Moreover, COX was generally found in excess and this excess compared with the aerobic mitochondrial capacity seems to be a basis for the high oxygen affinity of the mitochondrial respiration (Gnaiger et al., 1998). Thermally induced-changes in COX activity would therefore have little effect on the maximal respiration rate while still acting on regulation of respiration mainly through impact upon the redox state of ETS (Blier and Lemieux, 2001). Therefore, if the catalytic capacities of COX were not affected by disruption of genotypes by introgressions, maybe the threshold normally detected or the control over mitochondrial respiration, especially as we suggested in our previous study through impairment in process that drive the electron input into the ETS upstream the complex IV (Pichaud et al., in press), could be affected by these

disruptions. No distinctions at the level of the control were detected in our study since the K_i and the C_i for COX were not different between *sII*-introgressed and *sIII*-controls. A quite surprising result is the differences between control and introgressed organisms in the apparent COX excess capacity. We detected a COX excess capacity of approximately 193% for *sIII*-controls at 12°C. This threshold is in line with previous study in our laboratory which showed that apparent excess capacity from 188 to 230% were detected at 12°C in native *sII* and *sIII* mitotypes using the same method (Pichaud et al., in submission process). However, no threshold was measured for *sII*-introgressed organisms. This supports to our previous hypothesis that even if the catalytic capacities or the control level over respiration are not affected by the disruption of genotypes, mitonuclear co-adaptation appears essential to maintain the apparent COX excess capacity, at least at low temperature. Moreover, Melvin et al. (2008) did not find any fixed differences in the nuclear encoded COX genes of *Drosophila simulans*, which suggests that the nuclear DNA is not responsible for the differences detected in the COX excess capacity at 12°C. These differences may therefore only arise from the broken mitonuclear interactions. Consequently, we propose that co-adaptation of one mitotype to its own nuclear background is essential for the maintenance of the functional properties of COX to cope with low temperatures encountered by the species.

In terms of thermal sensitivity, important divergences were denoted between control and introgressed organisms particularly in the range 12-18°C where *sII*-introgressed have three fold higher Q_{10} than *sIII*-controls. In native mitotypes, we detected differences between *sII* and *sIII* but it was *sII* that had the smaller Q_{10} for all the parameters measured and in all cases, the Q_{10} were close to 1 (Pichaud et al., in press). We hypothesized that the overall lower Q_{10} values from 12 to 18°C might allow *sII* to colonize different thermal or spatial niches, which is in line with its wider worldwide distribution while *sIII* is endemic to continental east Africa, Madagascar and Reunion Island (Ballard, 2004). In *sII*-introgressed flies, Q_{10} reached a value far beyond 1 (3.2 to 5.4), which denotes a strong influence of temperature. These results are consistent with the hypothesis that the introgression of the *sII* mitotype in

the nuclear environment of *sIII* may impair the ability to adapt to low temperatures. All together, these results strongly suggest that selection pressure on ETS enzymes could be generated by the adaptation of a population to its environment leading to changes in both nuclear-encoded and mitochondrial-encoded subunits of ETS complexes. In our case, the changes do not affect the catalytic capacities or the regulation over the mitochondrial respiration but when the mitonuclear interactions are disrupted, the organisms may exhibit impaired ability to cope with temperature changes. The mitotypes *sII* and *sIII* are closely related sympatric populations and it is possible that due to the subtle divergences in their mitochondrial genome only their ability to cope with temperature variation is affected by broken mito-nuclear interactions.

Another surprising result is the differences between *sII*-introgressed and *sIII*-control organisms at the level of PDH activity. PDH complex is strictly encoded by nuclear genes and since the nuclear environment was theoretically the same between control and introgressed flies, the differences detected in the PDH activity at all the temperature tested were unexpected. As said earlier, it may be due to a limitation of the backcrossing strategy. Another explanation would be that expression of PDH is partly controlled by mtDNA. It has been suggested that PDH activity could be rate limiting particularly at low temperature (Blair and Guderley, 1993b; Lemieux et al., 2010) which would endorse expectation in a population adapted to lower thermal regime.

We have shown in this study that disruption of genotypes impairs the ability to perform at different thermal regimes. Our results showed that even if the catalytic properties of the ETS are not affected by introgressions, the impact of temperature diverges between the two mitotypes studied, which reflect the differences in the apparent excess of COX capacity mainly at low temperature. The mitotypes *sII* and *sIII* are closely related sympatric populations and it is possible that only their ability to cope with temperature variation is affected by the alteration of mito-nuclear interactions. Ballard et al. (2007) showed that *D. simulans sII* flies have greater egg size and fecundity. Further studies on thermal sensitivity of OXPHOS control of

mitochondrial metabolism at different temperature and overall performance on whole organisms are therefore require to delineate if the divergences observed in the present study associated to mitochondrial mitotype have significant impact on fitness and have any adaptive value. Nevertheless, this is the first study in our knowledge that make a clear demonstration that one mitotype observed in a natural population can confer phenotypic divergences in term of thermal sensitivity of the mitochondrial metabolism.

4.6 Acknowledgments

The authors are deeply indebted to C. Jutras for his help with virgin females. R.M. Tanguay work is supported by a grant from the Canadian Institute of Health Research. This study was supported by research grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) to P.U. Blier.

CHAPITRE V : DISCUSSION

L'objectif de cette thèse de doctorat était de mieux comprendre les effets de la température sur le métabolisme mitochondrial et de mettre en évidence le potentiel adaptatif des divergences d'ADN mitochondrial. *Drosophila simulans* a été choisi en tant que modèle biologique parce que c'est une espèce à la fois ectotherme et dont il existe à l'état naturel plusieurs haplotypes mitochondriaux qui ont été séquencés. Cette diversité mitochondriale nous a permis de déterminer l'influence de la variabilité de l'ADNmt sur le métabolisme mitochondrial à différentes températures. Pour cela, nous avons tout d'abord mesuré les performances mitochondriales et leur thermosensibilité grâce à des isolations mitochondriales (approche *in vitro*) dans chacun des deux haplotypes, sII et sIII, vivant en sympatrie à l'état naturel. Spécifiquement, les activités catalytiques du complexe I et du complexe III de l'ETS, les activités de la CS et de la COX, l'excès apparent de COX ainsi que quelques biomarqueurs du stress oxydant ont été mesurés dans ces deux haplotypes à quatre températures différentes (chapitre 2, article 1). Cette méthode a permis d'évaluer notamment l'intégrité fonctionnelle des mitochondries ainsi que la capacité maximale de la phosphorylation oxydative à différentes températures. Cependant, même si des résultats très intéressants sur la gestion du flux d'électrons par l'ETS en fonction de la température ont été mis en évidence, nos résultats ont montré que les différences fonctionnelles mesurées (taux de respiration, ratios ADP/O) entre les deux mitotypes sont faibles. Cela suggère que les différences entre les deux haplotypes mitochondriaux ne peuvent pas expliquer les différences au niveau des performances mitochondriales (Pichaud et al., 2010). Ces conclusions nous ont donc mené à développer une méthode plus appropriée et plus précise pour mesurer la respiration mitochondriale de façon plus poussée que ce que nous avons fait avec l'approche *in vitro*. C'est pourquoi l'approche *in situ* a été choisie dans le chapitre 3 car l'étude des mitochondries fonctionnelles dans les fibres musculaires perméabilisées permet une estimation physiologiquement pertinente dans un

système cellulaire intègre où les mitochondries sont dans leur position normale et dans leur assemblage normal et où l'essentiel des interactions avec le cytosquelette, le noyau et le réticulum endoplasmique sont préservées. Grâce à cette méthode et à sa comparaison avec l'approche *in vitro*, nous avons pu valider et appliquer l'approche *in situ* aux Drosophiles, ce qui constitue la première étude effectuée sur des fibres perméabilisées d'invertébrés. De plus, grâce à l'utilisation d'un respiromètre à haute résolution (Oxygraph 2k, Oroboros Instruments, Innsbruck, Autriche), il a été possible de déterminer de manière précise le flux d'électrons dans l'ETS aux différentes températures déjà testées dans le chapitre 2 et cela de manière beaucoup plus intégrative puisque l'activité catalytique des différents complexes de l'ETS (complexe I, II, III et IV) ainsi que leur action combinée ont pu être mesurées. L'étude des performances mitochondriales effectuée dans le chapitre 2 n'a pas permis de déterminer précisément si les divergences de l'ADNmt était associées aux divergences des fonctions mitochondriales. Bien que les haplotypes *s_{III}* et *s_{III}* se distinguent l'un de l'autre par les séquences d'ADNmt, il reste possible que les génomes mitochondriaux ne soient pas suffisamment divergents pour induire des différences subtiles et parfois extrêmement difficiles à mesurer dans les performances mitochondriales de mitochondries isolées. En plus de mettre en évidence l'importance de prendre en compte la convergence des différentes branches amenant les électrons au niveau de la jonction Q (complexe I, complexe II et glycérol-3-phosphate déshydrogénase mitochondriale) lors d'études sur la respiration mitochondriale, le chapitre 3 a permis de récolter un grand nombre d'informations sur les propriétés fonctionnelles et sur la régulation de l'ETS à différentes températures. Même si beaucoup d'indices ont laissé supposer que la différence entre haplotypes au niveau de la thermo-sensibilité des complexes de l'ETS était liée à la sélection d'un ADNmt qui permettrait à l'un des haplotypes d'assurer une meilleure performance dans son environnement spécifique, encore une fois il a été impossible de conclure que les divergences des propriétés fonctionnelles étaient entièrement dues aux variations dans l'ADNmt. Étant donné que les complexes enzymatiques du système de transport des électrons sont codés à la fois par l'ADN nucléaire et l'ADNmt (à l'exception du complexe II), les

différences observées entre les haplotypes peuvent être influencées par l'ADN nucléaire ou l'ADNmt, ou encore par les interactions mitonucléaires. Une des meilleures façons de répondre à la question du potentiel adaptatif des variations du génome mitochondrial était donc logiquement d'effectuer le transfert de l'ADNmt d'un haplotype dans l'environnement nucléaire de l'autre haplotype. Ce transfert peut être effectué par différents moyens : par microinjection, en produisant des cellules cybrides, ou par rétrocroisements. L'utilisation d'une de ces méthodes peut également entraîner un bris des interactions mitonucléaires entre les deux génomes. Ainsi, une diminution des performances mitochondriales lors du transfert de l'ADNmt peut signifier que les interactions mitonucléaires jouent un rôle important dans les fonctions mitochondriales et que la co-évolution de ces génomes est essentielle au développement de phénotype adaptés à des environnements particuliers. Si, au contraire, les performances mitochondriales sont maintenues, et ce même après le transfert de l'ADNmt dans un environnement nucléaire différent, cela signifie que l'ADNmt influence les fonctions mitochondriales et les module afin de permettre à l'organisme de s'adapter aux variations de température et que, à l'échelle des divergences des haplotypes, les interactions mitonucléaires ont peu d'impact sur ces ajustements des propriétés fonctionnelles des mitochondries. Dans le chapitre 4, nous avons choisi d'utiliser la méthode de rétrocroisement qui permet l'introgession de l'ADNmt d'un haplotype dans l'environnement nucléaire de l'autre haplotype parce qu'elle est moins invasive comparativement aux deux autres méthodes. Dans le contexte de notre étude, un haplotype « introgressé » (avec l'ADNmt de *sII* introgressé dans le génome nucléaire de *sIII*) et un haplotype « contrôle » (mêmes rétrocroisements que pour l'haplotype « introgressé » mais en utilisant l'ADNmt et l'ADN nucléaire de *sIII*) ont été créés. Les performances mitochondriales ont ensuite été mesurées aux différentes températures testées dans le chapitre 2 et dans le chapitre 3 en utilisant l'approche *in situ* et les résultats ont été comparés entre l'haplotype « contrôle » et l'haplotype « introgressé ». Selon nos connaissances, cette étude est l'une des premières démonstrations expérimentales claires de l'impact des divergences des haplotypes mitochondriaux sur les propriétés fonctionnelles des mitochondries et de leurs thermosensibilités dans un

environnement nucléaire similaire à différents régimes de température.

5.1 Thermosensibilité du métabolisme mitochondrial *in vitro*

La mesure de l'activité des deux enzymes du cycle des acides tricarboxyliques, CS et ACO, n'ont pas montrées de différences entre les deux haplotypes (*sII* et *sIII*). Du fait que ces deux enzymes sont strictement codées par l'ADN nucléaire, ces résultats ont donc indiqué qu'il ne semble pas y avoir de divergences des propriétés fonctionnelles des mitochondries induites par le génome nucléaire.

L'ACO peut aussi servir de marqueur du stress oxydant induit par les ions superoxydes dans la matrice mitochondriale. Les résultats sur l'activité de l'ACO ont donc suggéré que le stress oxydant ne variait pas selon les haplotypes. Les mesures de TBars sont venues corroborer cette suggestion puisque leurs valeurs demeuraient constantes entre les haplotypes. Le seul marqueur de stress oxydant ayant présenté une différence entre haplotype était l'activité de la catalase (CAT) où il y avait une activité plus élevée pour *sII* à 18, et à 28°C où *sIII* a une activité plus élevée. Cependant, il a été proposé que cette différence de la thermosensibilité de l'activité de CAT pourrait provenir de l'expression de différents allozymes dans les deux populations (ce qui reste à vérifier).

Les taux maximaux de respiration mitochondriale (stade3m) ont été atteints à 24°C pour les deux haplotypes lorsque le complexe I était réduit par la combinaison pyruvate + malate + proline. La seule différence entre haplotypes se situait à 18°C au niveau du complexe I et du complexe III où *sII* présentait des capacités catalytiques plus élevées que *sIII*. Une diminution des capacités mitochondriales lorsque celles-ci sont alimentées à partir du complexe I a aussi été observée entre 24 et 28°C, ce qui n'a pas été le cas lorsque les électrons sont fournis au niveau du complexe III. Ces résultats ont donc suggéré que cette diminution des taux de respiration au niveau du complexe I serait due à une diminution d'activité d'enzymes

en amont du complexe III.

Les différences détectées pour le stade 3m ont aussi été détectées pour le stade 4o à toutes les températures au niveau complexe I, et à 18°C au niveau du complexe III. À 18 et 24°C *sII* avait un stade4o plus élevé pour le complexe I et III alors qu'à 12 et 28°C, *sIII* avait le stade4o le plus élevé mais seulement pour le complexe I. Puisque lors du stade 4 les productions d'O₂⁻ et de H₂O₂ sont supposées être élevées, ces résultats sur le stade 4o étaient consistants avec une étude précédente démontrant une plus grosse production d'H₂O₂ dans l'haplotype *sII* à 25°C (Katewa et Ballard, 2007). Cela peut suggérer que *sII* serait mieux adapté à une plus grande échelle de température que *sIII* si le stade 4o est corrélé avec la production de ROS. Si le stade 4o plus faible de *sIII* à 18 et 24°C signifie en effet une plus faible production de ROS, alors cet haplotype serait avantagé par rapport à l'haplotype *sII* à ces températures, alors qu'à 12 et 28°C ce dernier serait avantagé. Les plus faibles ratios ADP/O pour l'haplotype *sIII* à 12°C au niveau du complexe I et à 28°C au niveau du complexe III viennent appuyer cette hypothèse puisque cela dénote une plus faible efficacité de la phosphorylation oxydative à ces températures. De plus, la distribution géographique des deux populations vient aussi corroborer cette hypothèse car *sIII* est endémique à l'Afrique de l'est, Madagascar et à l'île de la Réunion alors que *sII* à une aire de distribution plus étendue. Cependant cette hypothèse de différenciation des niches au niveau spatial n'exclut pas une possible différenciation des niches au niveau temporel.

Les résultats sur les RCRs, indicateurs de l'intégrité des fonctions mitochondriales, ont montré pour les complexes I et III une bonne respiration couplée, *sII* ayant un plus grand RCR ainsi qu'un plus grand ratio ADP/O au niveau du complexe I lorsque ces paramètres ont été mesurés à 12°C. Ces résultats ont suggéré que *sII* avait possiblement une plus grande efficacité au niveau de l'oxydation des substrats et de la phosphorylation de l'ADP à 12°C. Les faibles RCRs détectés à 18 et 28°C ont suggéré que la combinaison de substrats pour réduire le complexe I serait associée à une plus faible efficacité de phosphorylation à ces températures, ce qui était conforme aux faibles ratios ADP/O calculés pour les

mêmes températures. Les plus hauts ratios ADP/O pour le complexe I ont été détectés à 24°C (Fig. 2.2). La diminution de ces ratios aux autres températures était possiblement induite par une plus grande thermosensibilité du stade3m comparativement au stade4o, ce qui a été illustré par les RCRs (Fig. 2.3). Cependant et de manière surprenante, les RCRs élevés détectés à 12°C pour les deux haplotypes ne correspondaient pas à des ratios ADP/O élevés. L'efficacité de phosphorylation est pourtant supposée être corrélée à l'intégrité des fonctions mitochondriales. Il y a donc une perte de l'efficacité de phosphorylation à 12°C lors du stade 3m.

Au niveau de l'activité de la COX (Fig 4.4), une augmentation régulière de 12 à 28°C a été observée tel qu'illustré par les Q_{10} . Ces résultats ont donc suggéré que la COX n'était pas responsable de la réduction des capacités catalytiques des mitochondries observée à 28°C au niveau du complexe I (stade 3m, Fig 2.2). Cette diminution devait donc être logiquement due aux complexes en amont de l'ETS (complexe I, II ou III) ou aux déshydrogénases qui contrôlent l'entrée des substrats dans l'ETS. L'excès apparent de COX a été mesuré lors d'un flux élevé d'électrons dans l'ETS. Le seul excès apparent a été détecté à 12°C pour les deux souches (604% et 613% pour *sII* et *sIII* respectivement). Ces résultats nous ont amener à suggérer qu'à 12°C il y avait une limitation au niveau de l'entrée des électrons dans l'ETS qui est probablement induite par les déshydrogénases en amont de l'ETS. Aux autres températures, aucun excès n'a été détecté et le contrôle de la capacité de l'OXPPOS par la COX devrait être alors important (comme démontré par les résultats sur le coefficient de contrôle métabolique, C_i), ce qui a suggéré que lorsque l'ETS est proche de la saturation en électrons, le système était proche de sa limite et donc que le complexe IV ne présentait pas d'excès.

Ce chapitre a permis de montrer que les différentes enzymes de l'ETS ont différentes thermosensibilités, ce qui peut mener à une répartition différente du contrôle au niveau de l'ETS et des déshydrogénases en amont en fonction de la

température, et spécifiquement à 12°C où la COX exerce un faible contrôle sur les taux de respiration. À ce stade d'expérimentation, nous n'avons cependant pas pu conclure sur le potentiel adaptatif des variations du génome mitochondrial principalement parce que les différences détectées lors des variations de température n'étaient pas consistantes parmi les divers paramètres mesurés. En effet, les différences fonctionnelles mesurées (taux de respiration, RCRs, ratios ADP/O) n'ont pas pu être spécifiquement corrélées aux variations de l'ADNmt. Ces paramètres fonctionnels n'ont pas pu relier les divergences entre haplotypes à des adaptations spécifiques aux niches écologiques des deux populations. C'est pourquoi, dans le chapitre 3, une nouvelle méthode a été développée en utilisant une approche *in situ* sur les fibres musculaires perméabilisées afin d'évaluer de nouveau les propriétés fonctionnelles des mitochondries et de vérifier si une approche à plus haute résolution (approche *in situ*) permettrait de dégager des divergences fonctionnelles qui auraient pu au préalable nous avoir échappées. Ainsi les capacités catalytiques des différents complexes de l'ETS et le flux d'électron provenant de trois branches différentes (complexe I, complexe II et glycérol-3-phosphate déshydrogénase mitochondriale) convergeant vers la jonction Q ainsi que l'activité enzymatique de la PDH (qui permet l'entrée des électrons dans l'ETS) ont été mesurés.

5.2 Thermosensibilité des fonctions mitochondriales *in situ*

Les RCRs obtenus au niveau du complexe I avec l'approche *in situ* étaient assez similaires à ceux obtenus avec l'approche *in vitro* et ce à toutes les températures testées. De même, l'ajout de cytochrome *c* n'a pratiquement pas eu d'effet sur la respiration mitochondriale ce qui nous assurait de l'intégrité fonctionnelle de la membrane externe des mitochondries. Ces résultats ont suggéré que la méthode *in situ* était appropriée pour évaluer les fonctions mitochondriales et était même surement plus pertinente que la méthode *in vitro* car l'environnement cellulaire était préservé.

Les résultats sur les SCRs ont montré que l'ajout de succinate augmentait significativement le taux de respiration mitochondriale. Il a toujours été suggéré que le succinate ne traversait pas les membranes mitochondriales chez la *Drosophile* et donc que son ajout n'entraînait pas d'augmentation significative des taux de consommation d'oxygène. Ce fut donc la première fois que le succinate était pris en compte pour l'évaluation des capacités catalytiques des complexes de l'ETS chez la *Drosophile* et les résultats ont fortement suggéré qu'il était essentiel de considérer l'entrée des électrons au niveau du complexe II comme une branche convergeant vers la jonction Q chez cet organisme. De plus le complexe II est seulement codé par des gènes nucléaires et aucunes différences dans les SCRs ou dans les flux d'O₂ n'ont été détectées entre les deux haplotypes. Ceci a suggéré que les gènes nucléaires avaient peu d'impact sur les divergences des fonctions mitochondriales entre les deux populations. Cette suggestion était aussi appuyée par l'activité de la PDH (aussi entièrement codée par des gènes nucléaires) qui ne montrait aucunes différences entre les deux haplotypes.

Les taux de respiration ont montré que lorsque l'ETS était approvisionné avec les substrats permettant le transfert des électrons au niveau des trois branches, des différences étaient détectées à 24°C entre les deux haplotypes (*sII* ayant des plus hauts taux de respiration) et ces différences persistaient après l'ajout d'un découpleur ainsi qu'après l'ajout des inhibiteurs respectifs des complexes I et II. Ces résultats démontrent donc que l'ETS de l'haplotype *sII* possède des capacités catalytiques plus élevées. Ces différences étaient notamment significatives à 24°C lorsque le flux d'électron dans l'ETS est le plus élevé (CII+G3Pdh et CII+G3Pdh+u), et lorsque les complexes I et II étaient inhibés (CII+G3Pdh+u et G3Pdh+u). L'activité de la COX était également supérieure pour *sII* à 24°C. Il est ainsi possible que le flux plus élevé détecté pour *sII* fût induit par une plus grande entrée d'électrons au niveau de la G3Pdh mitochondriale. Cependant cette enzyme est seulement codée par des gènes nucléaires et nous pouvions donc supposer que la G3Pdh n'était pas différente entre les haplotypes. Ainsi, il a été fortement suggéré que les capacités catalytiques plus élevées pour *sII* étaient associées à l'efficacité

des complexes III et IV à utiliser le flux d'électron ce qui a pu être confirmé par les plus hautes capacités catalytiques de la COX pour *sII*.

Comme pour le chapitre 2, un excès apparent de COX a été détecté seulement à 12°C. Cependant, cet excès était nettement moins prononcé que chez des mitochondries isolées (188% et 230% pour *sII* et *sIII* respectivement). Cette différence provenait très certainement des différences entre les approches *in situ* et *in vitro*. Notamment, un plus grand nombre de substrats a été utilisé dans l'approche *in situ* ce qui pourrait en partie expliquer ces différences. De plus, il a déjà été démontré que l'excès apparent de COX est généralement plus élevé dans des mitochondries isolées que dans des fibres perméabilisées (Villani et al., 1998; Kunz et al., 2000). De 18 à 28°C aucun excès n'a été détecté suggérant que l'activité maximale de COX ne pouvait pas supporter des taux de respiration plus élevés que ceux mesurés lors du stade3m à ces températures. Cependant, l'excès détecté à 12°C suggère que la COX a des capacités catalytiques plus élevées que celles requises pour supporter le stade 3m. Ces résultats ont donc suggéré que la limitation dans les capacités catalytiques de la COX à 12°C provenait certainement des réactions en amont de l'oxydation du cytochrome c. Cette hypothèse est appuyée par les résultats sur les UCRs puisque même à 12°C, aucune augmentation des taux de respiration n'a été détectée après l'ajout d'un découpleur ce qui indique que la limitation au niveau des capacités catalytiques ne provient pas de l'ATP synthase ou de l'ANT. De plus, du fait que l'activité relative des différents complexes ne variait pas lorsqu'elle était comparée à l'activité de la COX à différentes températures, nous pouvons supposer que la limitation ne provient pas des autres complexes de l'ETS et donc pourrait provenir d'une altération des déshydrogénases en amont qui permettent l'entrée des électrons dans l'ETS. Cette hypothèse n'a cependant pas pu être vérifiée avec cette étude même si les résultats obtenus sur l'activité de la PDH ont fortement suggéré qu'à 12°C cette enzyme ne pouvait supporter l'entrée d'un flux élevé d'électrons dans l'ETS, ce qui résultait en un excès apparent de COX.

Les résultats sur les Q_{10} ont montré une importante divergence dans l'impact de

la température sur les fonctions mitochondriales entre les deux haplotypes. Cela a fortement suggéré que les différences dénotées entre les haplotypes étaient induites par des divergences dans les propriétés fonctionnelles des composants de l'ETS et non par de simples ajustements quantitatifs.

Dans ce chapitre, nous avons démontré que l'approche *in situ* est totalement appropriée pour l'évaluation des performances mitochondriales chez les invertébrés et est même plus pertinente que l'approche *in vitro* puisque les interactions cellulaires sont préservées dans les fibres perméabilisées. Il a aussi été démontré que l'ajout de succinate augmente les taux de respiration chez la *Drosophile*, contrairement à ce que l'on pensait jusqu'à présent, et que le complexe II devait donc être pris en compte pour l'évaluation des fonctions mitochondriales. L'excès apparent de COX détecté à 12°C est certainement dû à une altération au niveau de déshydrogénases spécifiques permettant l'entrée des électrons dans l'ETS. Ces résultats sont partiellement confirmés par l'activité de la PDH qui est très faible à 12°C. Les différences de thermosensibilités des complexes de l'ETS entre les deux haplotypes peuvent résulter de la sélection d'un haplotype pour mieux performer dans son environnement spécifique mais nous n'avons pas pu conclure, encore une fois, que ces différences résidaient entièrement au niveau des divergences de l'ADNmt. Il est toujours possible qu'elles soient dues aux interactions entre les deux génomes ou à des paramètres codés par le génome nucléaire que nous n'aurions pas mesurés. Dans le chapitre 4, nous avons donc logiquement essayé de briser ces interactions mitonucléaires à l'aide d'introgessions contrôlées afin de savoir si elles étaient responsables de l'adaptation des fonctions mitochondriales aux différentes températures. Nous avons donc comparé les performances mitochondriales d'un haplotype altéré (*sII*-introgressé, ayant l'ADNmt de *sII* et l'ADN nucléaire de *sIII*) et d'un haplotype maintenu (*sIII*-contrôle, ayant l'ADNmt et l'ADN nucléaire de *sIII*). En effet, si les divergences observées entre haplotypes mitochondriaux sont associées à des phénotypes adaptatifs, alors les différences dans les propriétés fonctionnelles des mitochondries décrites dans le chapitre 3 pour les haplotypes *sII* et *sIII* devraient être également détectées en transférant l'ADNmt

de *sII* dans l'environnement nucléaire de *sIII*.

5.3 Potentiel adaptatif associé aux divergences de l'ADN mitochondrial

Les RCRs mesurés *in situ* sur les haplotypes *sII*-introgressé et *sIII*-contrôle ont montré une bonne respiration couplée bien qu'un peu inférieurs à ceux mesurés par la même approche sur *sII* et *sIII*. Aucune différence entre l'haplotype altérés (*sII*-introgressé ayant subi un bris des interactions mitonucléaires) et l'haplotype maintenu (*sIII*-contrôle) n'a été détectée au niveau des RCRs. Ceux-ci sont cependant plus élevés à 24°C que pour *sII*-introgressé à 12°C et que pour *sIII*-contrôle à 28°C. Ces résultats suggèrent une possible différence dans l'impact de la température avec les plus bas RCRs détectés à 12°C pour les haplotypes ayant été altérés (*sII*-introgressé) et à 28°C pour les haplotypes maintenus (*sIII*-contrôle). De plus, l'ajout de cytochrome *c* n'a pas provoqué d'augmentation des taux de respiration, confirmant l'intégrité de la membrane externe des mitochondries des deux haplotypes.

Au niveau des taux de respiration, des différences significatives entre *sII*-introgressé et *sIII*-contrôle ont été détectées à 24°C, avec *sII*-introgressé ayant des capacités catalytiques plus élevées pour Clc+CII, Clc+CII+G3Pdh et pour Clc+CII+G3Pdh+u. Ces résultats étaient donc quasiment similaires à ceux obtenus avec l'approche *in situ* sur les haplotypes *sII* et *sIII*, d'autant plus que les mêmes patrons (mais sans différences significatives) ont aussi été mesurés pour CII+G3Pdh+u, pour G3Pdh+u ainsi que pour la COX (Fig 5.1).

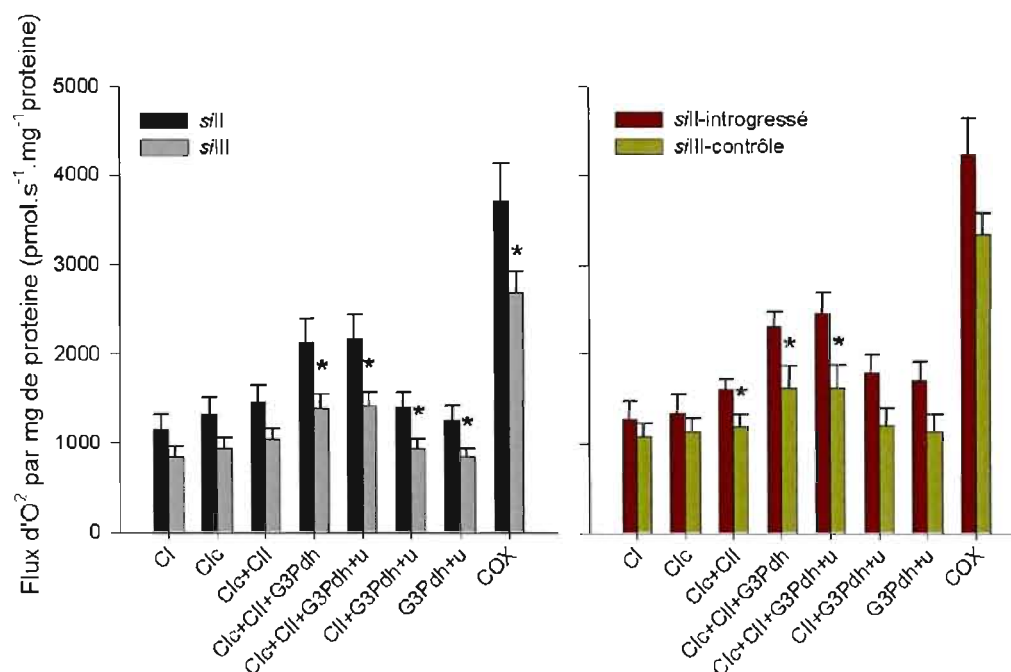


Figure 5.1 Flux d'oxygène (exprimés en pmol d'O₂ consommés par seconde par mg de protéine) mesurés *in situ* à 24°C dans les haplotypes *sII* et *sIII* ainsi que dans les haplotypes altérés (*sII*-introgressé) et maintenus (*sIII*-contrôle). Les fonctions mitochondriales ont été mesurées avec pyruvate+malate+L-proline+ADP (CI), +cytochrome *c* (Clc), +succinate (Clc+CII), +*sn* glycerol-3-phosphate (Clc+CII+G3Pdh), +2,4-dinitrophenol (Clc+CII+G3Pdh+u), +rotenone (CII+G3Pdh+u), +malonate (G3Pdh+u), +antimycine A (Rox) +TMPD+ascorbate (COX) et les taux obtenus pour Rox ont été soustraits aux autres taux de respiration.

Cette similarité était aussi détectée avec les SCRs qui permettent de d'évaluer la contribution de chaque ajout de substrat sur la respiration. Ces résultats ont donc suggéré très fortement que les différences entre haplotypes introgressés et contrôles étaient dues aux divergences de l'ADNmt et qu'il n'y avait pas eu d'altération des capacités catalytiques ou de l'efficacité d'oxydation des substrats des différents complexes de l'ETS dues aux bris des interactions mitonucléaires.

Au niveau de la capacité catalytique de la COX, aucune altération qui aurait pu être induite par un bris des interactions mitonucléaires n'a été détectée. Cependant,

si les capacités catalytiques de la COX ne sont pas affectées par l'altération des génotypes (*sII*-introgressé) induite par le bris des interactions mitonucléaires, peut-être que le seuil biochimique détecté normalement (et donc l'excès apparent de COX) ou le contrôle sur la respiration mitochondriale sont eux affectés par ce bris. Aucune différence au niveau du contrôle de la COX sur la respiration mitochondriale n'a été détectée entre les deux haplotypes. Comme dans les études précédentes sur *sII* et *sIII* (mitochondries isolées et approche *in situ*), un excès apparent de COX a été détecté à 12°C. Cet excès a été mesuré pour *sIII*-contrôle (193%, ce qui était consistant avec l'excès détecté dans l'approche *in situ* sur *sII* et *sIII*) mais aucun excès n'a été détecté pour *sII*-introgressé. Ainsi, l'explication la plus plausible était que même si les capacités catalytiques ou le niveau de contrôle sur la respiration n'étaient pas affectés par un bris des interactions mitonucléaires dans les génotypes altérés, ces interactions seraient essentielles au maintien de l'excès apparent de COX à basse température. Nous avons donc pu suggérer que les interactions entre l'ADNmt d'un haplotype et l'ADN nucléaire du même haplotype étaient essentielles pour le maintien des propriétés fonctionnelles de la COX afin de faire face aux basses températures que l'espèce peut rencontrer.

Au niveau de la thermosensibilité, d'importantes différences ont été observées pour les Q_{10} entre les haplotypes, particulièrement entre 12 et 18°C où *sII*-introgressé a un Q_{10} trois fois supérieur à *sIII*-contrôle. Dans l'étude des fonctions mitochondriales *in situ* dans *sII* et *sIII*, les Q_{10} semblaient indiquer que *sII* pouvait coloniser différentes niches spatiales (Q_{10} proches de 1 dans *sII* pour cet écart de température, ce qui dénote une faible influence de la température) ce qui était corrélé par la plus grande répartition géographique de l'haplotype *sII* comparativement à *sIII*. Les valeurs élevées de Q_{10} ainsi que l'absence d'excès de COX mesurés dans *sII*-introgressé suggèrent donc que l'introgression de l'ADNmt de *sII* dans l'environnement nucléaire de *sIII* affecterait la capacité d'adaptation aux basses températures.

Les résultats sur la PDH ont montré des différences d'activités entre *sII*-introgressé (ayant une plus grande activité à toutes les températures) et *sIII*-contrôle

(Fig. 4.6), ce qui était surprenant du fait que le complexe de la PDH est strictement codé par les gènes nucléaires. Cela a été suggéré comme étant possiblement dû à une limitation au niveau des rétrocroisement. Une autre possibilité serait que l'expression de la PDH dépendrait en partie de l'ADNmt. Ces différences ne peuvent cependant pas expliquer totalement les différences détectées dans les taux de respiration à 24°C.

Les résultats du chapitre 4 ont démontré que l'altération des génotypes induite par le bris des interactions mitonucléaires (dans *sII*-introgressé) n'affectent pas les capacités catalytiques des mitochondries. De ce fait, nous pouvons supposer que les fonctions mitochondriales sont principalement conférées par l'ADN mitochondrial et non par l'ADN nucléaire ou par les interactions mitonucléaires. Un autre résultat important au niveau de cette étude est que même si les propriétés catalytiques de l'ETS ne sont pas affectées par les introgressions, la température a un impact différent sur les deux mitotypes comme démontré par les résultats sur l'excès apparent de COX à 12°C. Les haplotypes *sII* et *sIII* sont des populations sympatriques étroitement liées et il est possible que du fait de la faible divergence de leur ADNmt, seulement leur capacité à faire face aux variations de température soit affectée lors de l'altération des génotypes. Cependant, les différences des capacités catalytiques des différentes enzymes de l'ETS (importantes dans l'élaboration de la force proton-motrice et donc dans la production d'énergie par la cellule) peuvent être reliées aux divergences de l'ADN mitochondrial et donc que ces divergences auraient un potentiel adaptatif.

5.4 Perspectives

5.4.1 Interactions entre génome nucléaire et génome mitochondrial

Étant donné l'étroite association entre les protéines codées par l'ADN nucléaire et par l'ADNmt dans les différents complexes de l'ETS et leur importance dans la

production d'énergie, les interactions entre ces protéines peuvent avoir menées à une sélection tout au long de l'histoire évolutive de ces complexes (Willett et Burton, 2004). De plus, les pressions de sélection exercées sur les enzymes de l'ETS ont pu être générées par l'environnement, particulièrement au niveau de la température chez les ectothermes, menant ainsi à des changements au niveau des sous-unités des complexes de l'ETS codées par les deux génomes (Willett et Burton, 2004; Ellison et Burton, 2006). Plusieurs études sur des populations isolées de copépodes *Tigriopus californicus* ont montré que l'hybridation entre ces populations altère les complexes de gènes responsables des interactions mitonucléaires évoluant à l'intérieur d'une population (Willett et Burton, 2001; Rawson et Burton, 2002; Willett et Burton, 2004; Ellison et Burton, 2006; Ellison et Burton, 2007; Ellison et Burton, 2008). Particulièrement, dans des croisements entre populations, les hybrides mitonucléaires présentaient des taux d'activité de COX beaucoup plus faibles, suggérant que les interactions mitonucléaires étaient essentielles dans l'élaboration des propriétés fonctionnelles des mitochondries (Edmans et Burton, 1998). De plus Ellison et Burton (2006) ont aussi montré que des disparités mitonucléaires provoquaient une diminution des activités des complexes I et III et de la production d'ATP entre hybrides de populations allopatriques. Dans le contexte de notre étude, l'altération des génotypes induite par le bris des interactions mitonucléaires n'entraîne pas de diminution des capacités catalytiques. Cependant, les résultats obtenus sur les Q_{10} (trois fois plus élevés entre 12 et 18°C pour *s_{III}*-introgressé) et sur l'excès apparent de COX (pas d'excès à 12°C pour *s_{III}*-introgressé) suggèrent que le bris des interactions mitonucléaires induirait une diminution de la capacité à s'adapter à différents régimes thermiques et particulièrement à basse température. Nos résultats ont donc montré que même si les capacités catalytiques ou la régulation au niveau de l'ETS n'étaient pas affectées par les introgressions, l'impact de la température est différent entre l'haplotype introgressé et l'haplotype contrôle, principalement au niveau de l'excès apparent de COX et des Q_{10} . Les différences subtiles au niveau de l'ADNmt entre *s_{III}* et *s_{III}* n'entraînaient pas de bris notables des complexes et n'altèrent pas les fonctions mitochondriales. Nous pouvons quand même supposer que des propriétés structurelles des protéines mitochondriales sont

affectées sans que les propriétés fonctionnelles ne le soient. *sII* et *sIII* sont des populations étroitement reliées vivant en sympatrie à l'état naturel et il est donc possible que seule leur capacité à faire face aux variations de température serait affectée par le bris des interactions mitonucléaires. Il serait donc intéressant dans un premier temps de savoir à partir de quel niveau d'introgression la structure des protéines est affectée. En effet, la même expérience pourrait être effectuée mais en mesurant l'excès apparent de COX lorsque les ADN nucléaires des deux haplotypes coexistent. Par exemple, en prenant les progénitures des générations F_1 , ayant 100% de l'ADNmt de *sII* et un ADN nucléaire composé à 50% du génome nucléaire de *sII* et 50% du génome nucléaire de *sIII*, il serait possible de voir si l'excès apparent de COX à 12°C est altéré et donc si les propriétés mitochondriales sont dépendantes des interactions entre les deux génomes. De même, en poursuivant les expériences sur les générations F_2 , possédant 100% de l'ADNmt de *sII* et un ADN nucléaire composé à 25% de l'ADN nucléaire de *sII* et à 75% de l'ADN nucléaire de *sIII*, sur les générations F_3 , F_4 , F_5 , F_6 et F_7 il serait possible de déterminer avec précision à quel niveau d'introgression l'excès apparent de COX commence à diminuer, pour finalement disparaître totalement dans la génération F_8 .

Il serait aussi intéressant de vérifier si les propriétés fonctionnelles des mitochondries diffèrent dans des populations de *Drosophiles* plus divergentes au niveau de l'ADNmt. En effet, pour *Drosophila simulans*, les haplotypes *sII* et *sIII* ont des ADNmt plus divergents que *sII* et *sIII* au niveau des acides aminés codants pour le complexe I, pour le complexe III, pour le complexe IV ainsi que pour l'ATP synthase (Tableau 5.1, Ballard, 2005).

Tableau 5.6 Divergences des acides aminés de l'ADNmt au niveau de chaque complexe de l'ETS dans *Drosophila simulans* (*sI*, -II, -III) et *Drosophila melanogaster* (*D. mel*). Les nombres sont les moyennes des différences de comparaisons par paires ($\times 10^{-2}$) dans la région traduite, n'incluant pas les sites d'insertion/délétion dans *D. melanogaster* (adapté de Ballard, 2005).

	Complexe			
	I	III	IV	V
<i>sI</i> vs <i>sII</i>	1.61	0.31	0.70	2.30
<i>sI</i> vs <i>sIII</i>	1.68	0.60	0.32	1.89
<i>sII</i> vs <i>sIII</i>	1.00	0.30	0.39	0.42
<i>sI</i> vs <i>D. mel</i>	3.27	0.58	1.32	3.86
<i>sII</i> vs <i>D. mel</i>	3.00	0.27	1.69	2.42
<i>sIII</i> vs <i>D. mel</i>	3.34	0.56	1.40	2.01

De même, les haplotypes *sI* et *sIII* présentent également plus de divergences au niveau des acides aminés codant pour le complexe I, pour le complexe III et pour l'ATP synthase que les haplotypes *sII* et *sIII*. De plus, l'haplotype *sI* au niveau géographique n'a jamais été retrouvé avec les deux autres. Il serait donc intéressant de voir si cette plus grande variabilité d'ADN mitochondrial entraîne une divergence des propriétés fonctionnelles des mitochondries entre des populations vivant en allopatrie (par exemple entre *sI* et *sII* ou entre *sI* et *sIII*). Il serait aussi possible d'étudier si les divergences d'ADN mitochondrial ont un effet sur les propriétés fonctionnelles des mitochondries au niveau interspécifique. Par exemple, les différents haplotypes de *Drosophila simulans* peuvent s'hybrider avec l'haplotype de *Drosophila melanogaster* et quelque soit l'haplotype de *D. simulans*, les divergences sont encore plus nettes, surtout au niveau du complexe I, du complexe IV et de l'ATP synthase (Tableau 5.1). Ainsi, les différentes introgressions effectuées, soit au niveau intergénomique soit au niveau interspécifique, et la mesure des propriétés fonctionnelles des mitochondries selon la méthode *in situ* que nous avons mise au point permettrait de mieux comprendre la relation entre les différences des caractéristiques génétiques et les différences au niveau des performances mitochondriales.

5.4.2 Application de l'approche *in situ*

La mise au point de l'approche *in situ* dans des fibres musculaires perméabilisées d'invertébrés est un réel avancement pour l'étude des performances mitochondriales dans des conditions physiologiques pertinentes. En effet, cette méthode nous a notamment permis d'aller examiner de manière précise le flux d'électron dans l'ETS de fibres musculaires perméabilisées prélevées au niveau du thorax de *D. simulans*. Ballard et al. (2007) ont montré que les *Drosophiles* possédant l'haplotype *sll* avaient généralement une plus grande fécondité et de plus gros œufs. Du fait de cette différence au niveau du fitness, il serait donc intéressant de mesurer la capacité de l'OXPPOS et les capacités catalytiques des différents complexes de l'ETS dans des spermatozoïdes ayant un génome introgressé (bris des interactions mitonucléaires) et de les comparer à celles ayant un génotype maintenu (contrôle). Cela permettrait de déterminer si le bris des interactions mitonucléaires affecte aussi la performance des spermatozoïdes au niveau des propriétés fonctionnelles de leurs mitochondries. De plus, il est bien connu que le thorax des insectes volants possède un nombre de mitochondries élevé ainsi que des hauts taux de consommation d'oxygène (Chadwick, 1953; Van Den Bergh et Slater, 1962) et il n'est donc pas surprenant que l'approche *in situ* est fonctionnée sur ces organismes. Il serait donc intéressant d'appliquer la méthode *in situ* à d'autres espèces d'invertébrés moins actifs au niveau mitochondrial que les insectes volants. Par exemple, l'expérience pourrait être répétée chez un mollusque, chez un autre arthropode ou chez un annélide. Le copépode *Tigriopus californicus*, semble être un modèle bien défini et a été largement utilisé pour déterminer l'effet des divergences mitochondriales sur les propriétés fonctionnelles des mitochondries (Ellison et Burton, 2006; Ellison et Burton, 2007; Ellison et Burton, 2008). La méthode pourrait donc être appliquée afin de déterminer avec précisions les complexes de l'ETS affectés par un bris des interactions mitonucléaires. De même, l'utilisation d'un mollusque ou d'un nématode permettrait de mettre en évidence certains mécanismes de régulation non détectés chez les vertébrés mais présents chez les invertébrés. Par exemple, l'oxydase alternative, qui a été détectée récemment dans *Arctica islandica* et dans *Nereis pelagica* (Tschischka et al, 2000;

Abele et al., 2007) pourrait être mesurée quantitativement grâce à cette méthode. L'oxydase alternative serait enchâssée dans la membrane interne, du côté de la matrice mitochondriale entre la jonction Q et le complexe III. Cette oxydase alternative (AOX) réduit l'O₂ en H₂O en acceptant directement les électrons de la jonction Q et donc sans passer par le complexe III ou le complexe IV et sans pomper de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire. De plus, cette oxydase a une plus faible affinité pour l'O₂ que le complexe IV et n'est pas inhibée par les sulfides, le cyanure, l'azide, l'antimycine A et le myxothiazol. Il serait donc possible, grâce à la méthode *in situ* de mesurer l'activité de cette oxydase alternative afin de mieux comprendre dans quelles conditions physiologiques cette AOX est activée. Vu que beaucoup d'invertébrés ectothermes sont confrontés à des conditions environnementales drastiques (changements rapides de température et de concentration d'O₂) qui peuvent influencer leurs performances et leurs survies, il serait très intéressant d'appliquer les méthodes mises au point dans cette thèse afin de mieux comprendre les mécanismes physiologiques qui répondent aux variations environnementales et qui établissent les limites de la distribution d'une espèce. Par exemple, les espèces marines benthiques, lors de période d'hypoxie ou d'anoxie, ont leur complexe IV qui peut être inhibé par de hautes concentrations de sulfides présentes dans le sédiment. L'AOX permettrait donc à ces espèces de maintenir le flux d'électron, l'oxydation des substrats et le potentiel redox des cellules lors de ces périodes (Abele et al., 2007). L'activité de l'AOX pourrait alors être spécifiquement mesurée lorsque le complexe IV est inhibé (par exemple avec de l'azide) en utilisant différents substrats afin de déterminer si l'activité de l'AOX et le potentiel redox peuvent être régulés au niveau de l'entrée des substrats.

5.4.3 Contrôle de flux métabolique et température

Dans le contexte de notre étude, il serait aussi intéressant de se pencher un peu plus sur le contrôle des différentes composantes de l'ETS sur la régulation de la respiration mitochondriale. Dans cette thèse, nous avons choisi d'évaluer l'évaluation du contrôle de la COX sur la régulation de la respiration mitochondriale à l'aide du coefficient de contrôle métabolique. Cela nous a permis d'évaluer, à titre

comparatif, les effets d'un plus ou moins grand excès apparent de COX sur la respiration mitochondriale en fonction des haplotypes. Cependant, ce paramètre aurait du être complété par l'entière analyse du contrôle métabolique. En effet, il est possible, grâce à la mesure de la respiration mitochondriale et à la mesure de l'activité des enzymes de l'ETS ainsi que leurs inhibitions respectives d'évaluer les mécanismes physiologiques et les interactions impliquées dans le contrôle de certaines composantes de l'ETS sur la régulation de la respiration mitochondriale (Fell, 1997). De plus, en mesurant ce contrôle métabolique en fonction des variations de température, il serait possible de savoir comment la modulation de ces paramètres pourrait mener à la réponse métabolique observée chez les organismes. Pour cela, il suffirait de répéter la même expérience mais en effectuant des titrations des différents complexes à l'aide d'inhibiteurs spécifiques. Cela permettrait de mieux comprendre la répartition du contrôle des différentes enzymes de l'ETS sur la régulation de la respiration mitochondriale en fonction de la température et ainsi de mieux comprendre les mécanismes physiologiques impliqués dans les adaptations à la température.

L'étude des propriétés fonctionnelles des mitochondries en fonction des divergences au niveau de l'ADN mitochondrial est donc un point essentiel pour mieux comprendre l'association entre les caractéristiques génétiques et les performances mitochondriales. Selon nos connaissances, cette thèse est une des premières études à évaluer de façon précise les fonctions mitochondriales lors de différentes conditions d'entrée des électrons dans l'ETS à différentes températures. C'est aussi l'un des premiers tests empiriques clairs sur le potentiel adaptatif des divergences de l'ADNmt pour différents régimes de température dans des haplotypes possédant le même environnement nucléaire. Notre étude ouvre aussi la porte à un grand nombre d'applications, que ce soit au niveau de l'évolution des espèces, de la physiologie de ces espèces ainsi qu'afin de déterminer le lien entre le génotype mitochondrial et le phénotype de l'organisme. De plus, avec la prédiction que le réchauffement climatique est supposé mener à une augmentation des

températures moyennes ainsi qu'à une plus grande fréquence et une plus grande intensité des températures extrêmes (aussi bien élevées que basses), il est essentiel de considérer les conséquences de ces augmentations au niveau des propriétés fonctionnelles des mitochondries. Ainsi, cette thèse représente l'un des meilleurs moyens d'évaluer ces conséquences et de mieux les comprendre dans le contexte d'un environnement variable afin de mieux appréhender les mécanismes physiologiques en jeu lors de périodes de forte sélection évolutive.

RÉFÉRENCES

- Abele, D., Burlando, B., Viarengo, A. et Pörtner, H. O. 1998. "Exposure to elevated temperatures and hydrogen peroxide elicits oxidative stress and antioxidant response in the Antarctic intertidal limpet *Nacella concinna*". *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 120, p. 425-435.
- Abele, D., Heise, K., Pörtner, H. O. et Puntarelo, S. 2002. "Temperature-dependence of mitochondrial function and production of reactive oxygen species in the intertidal mud clam *Mya arenaria*". *Journal of Experimental Biology*, vol. 205, p. 1831-1841.
- Abele, D., Philipp, E., Gonzalez, P. M. et Puntarulo, S. 2007. "Marine invertebrate mitochondria and oxidative stress". *Frontiers in Bioscience*, vol. 12, p. 933-946.
- Andreyev, A. Y., Kushnareva, Y. E. et Starkov, A. A. 2005. "Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species". *Biochemistry*, vol. 70, p. 200-214.
- Aragonés, J., Schneider, M., Van Geyte, K., Fraisl, P., Dresselaers, T., Mazzone, M. et al. 2008. "Deficiency or inhibition of oxygen sensor Phd1 induces hypoxia tolerance by reprogramming basal metabolism". *Nature Genetics*, vol. 40, p. 170-180.
- Balaban, R. S., Nemoto, S., et Finkel, T. 2005. "Mitochondria, oxidants, and aging". *Cell*, vol. 120, p. 483-495.
- Ballard, J. W. O. 2000a. "Comparative genomics of mitochondrial DNA in members of the *Drosophila melanogaster* subgroup". *Journal of Molecular Evolution*, vol. 51, p. 48-63.

- Ballard, J. W. O. 2000b. "When one is not enough: Introgression of mitochondrial DNA in *Drosophila*". *Molecular Biology and Evolution*, vol. 17, p. 1126-1130.
- Ballard, J. W. O., Chernoff, B., et James, A. C. 2002. "Divergence of mitochondrial DNA is not corroborated by nuclear DNA, morphology, or behaviour in *Drosophila simulans*". *Evolution*, vol. 56, p. 527-545.
- Ballard, J. W. O. 2004. "Sequential evolution of a symbiont inferred from the host: *Wolbachia* and *Drosophila simulans*". *Molecular Biology and Evolution*, vol. 21, p. 428-442.
- Ballard, J. W. O. 2005. "*Drosophila simulans* as a novel model for studying mitochondrial metabolism and aging". *Experimental Gerontology*, vol. 40, p. 763-773.
- Ballard, J. W. O., Melvin, R. G., Katewa, S. D. et Maas K. 2007. "Mitochondrial DNA variation is associated with measurable differences in life-history traits and mitochondrial metabolism in *Drosophila simulans*". *Evolution*, vol. 61, p. 1735-1747.
- Ballard, J. W. O. et Melvin, R. G. 2010. "Linking the mitochondrial genotype to the organismal phenotype". *Molecular Ecology*, vol. 19, p. 1523-1539.
- Barja, G. et Herrero, A. 2000. "Oxidative damage to mitochondrial DNA is inversely related to maximum life span in the heart and brain of mammals". *The FASEB Journal*, vol. 14, p. 312-318.
- Baynes, J. W. 2002. "The Maillard Hypothesis on Aging: Time to Focus on DNA". *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 959, p. 360-367.
- Beckman, K. B. et Ames, B. N. 1998. "The Free Radical Theory of Aging Matures". *Physiological Reviews*, vol. 78, p. 548-571.

- Berrigan, D. 1997. "Acclimation of metabolic rate in response to developmental temperature in *Drosophila melanogaster*". *Journal of Thermal Biology*, vol. 22, p. 213-218.
- Berrigan, D. et Partridge, L. 1997. "Influence of temperature and activity on the metabolic rate of adult *Drosophila melanogaster*". *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, vol. 118, p. 1301-1307.
- Blier, P. U. et Guderley, H. R. 1993a. "Mitochondrial activity in rainbow trout red muscle: the effect of temperature on the ADP-dependence of ATP synthesis". *Journal of Experimental Biology*, vol. 176, p. 145-157.
- Blier, P. U. et Guderley, H.E. 1993b. "Effects of pH and temperature on the kinetics of pyruvate oxidation by muscle mitochondria from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)". *Physiological Zoology*, vol. 66, p. 474-489.
- Blier, P. U. et Lemieux H. 2001. "The impact of the thermal sensitivity of cytochrome c oxidase on the respiration rate of Artic charr red muscle mitochondria". *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 171, p. 247-253.
- Blier, P. U., Dufresne, F. et Burton, R. S. 2001. "Natural selection and the evolution of mtDNA-encoded peptides: evidence for intergenomic co-adaptation". *Trends in Genetics*, vol. 17, p. 400-406.
- Blier, P. U., Breton, S., Desrosiers, V., et Lemieux, H. 2006. "Functionnal conservatism in mitochondrial evolution: Insight from hybridization of Artic and Brook charrs". *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, vol. 306, p. 1-8.
- Bogenhagen, D. F. 1999. "Repair of mtDNA in vertebrates". *American Journal of Human Genetics*, vol. 64, p.1276-1281.

- Bokov, A., Chaudhuri, A., et Richardson, A. 2004. "The role of oxidative damage and stress in aging". *Mechanisms of Ageing and Development*, vol. 125, p. 811-826.
- Boushel, R., Gnaiger, E., Schjerling, P., Skovbro, M., Kraunsoe, R. et Flemming, D. 2007. "Patients with Type 2 diabetes have normal mitochondrial function in skeletal muscle". *Diabetologia*, vol. 50, p. 790-796.
- Boveris, A. et Cadenas, E. 2000. "Mitochondrial production of hydrogen peroxide regulation by nitric oxide and the role of ubiquinone". *IUBMB Life*, vol. 50, p. 245-250.
- Brand, M. D., Chien, L-F., Ainscow, E. K., Rolfe, D. F. S., et Porter, R. K. 1994. "The causes and functions of mitochondrial proton leak". *Biochimica and Biophysica Acta*, vol. 1187, p. 132-139.
- Brand, M. D., Affourtit, C., Esteves, T. C., Green, K., Lambert, A. J., Miwa, S., Pakay, S. J., et Parker, N. 2004. "Mitochondrial superoxide: production, biological effects and activation of uncoupling proteins". *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 37, p. 755-767.
- Breton, S., Doucet Beaupré, H., Stewart, D. T., Hoeh, W. R. et Blier, P.U. 2007. "The unusual system of doubly uniparental inheritance of mtDNA : isn't one enough?" *Trends in Genetics*, vol. 23, p. 465-474.
- Campbell, N. A., et Reece, J. B. 1995. *Biologie*. Bruxelles : De Boeck-Wesmael.
- Campbell, D. R. et Waser, N. M. 2001. "Genotype-by-environment interaction and the fitness of plant hybrids in the wild". *Evolution*, vol. 55, p. 669-676.
- Chadwick, L. E. 1953. "The flight muscles and their control". In *Insect Physiology*, sous la dir. de K. D. Roeder, p. 648-655. New York: John Wiley and sons.

- Chamberlin, M. E. 2004. "Top-down control analysis of the effect of temperature on ectotherm oxidative phosphorylation". *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, vol. 287, p. 794-800.
- Chance, B., et Williams, C. M. 1956. "The respiratory chain and oxidative phosphorylation". *Advances in Enzymology and Related Areas of Biochemistry*, vol. 17, p. 65-134.
- Chang, R., et Papillon, L. 1998. *Chimie fondamentale*. Montréal : Chenelière-McGraw Hill.
- Chen, Q., Vazquez, E. J., Moghaddas, S., Hoppel, C. L., et Lesnefsky, E. J. 2003. "Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III". *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, p. 36027-36031.
- Clancy, D. J. 2008. "Variation in mitochondrial genotype has substantial lifespan effects which may be modulated by nuclear background". *Aging Cell*, vol. 7, p. 795-804.
- Criscuolo, F., Gonzalez-Barroso, M., Bouillaud, F., Ricquier, D., et Sorci, B. M. 2005. "Mitochondrial uncoupling proteins: new perspectives for evolutionary ecologists". *American Naturalist*, vol. 166, p. 686-699.
- Csordás, G., Renken, C., Várnai, P., Walter, L., Weaver, D., Buttle, K. F., Balla, T., Mannelle, C. A. et Hajnóczky, G. 2006. "Structural and functional features and significance of the physiological linkage between ER and mitochondria". *Journal of Cell Biology*, vol. 174, p. 915-921.
- Daniel, R. M., Danson, M. J., Eienthal, R., Lee, C. K. et Peterson, M. E. 2008. "The effect of temperature on enzyme activity: new insights and their implications". *Extremophiles*, vol. 12, p. 51-59.
- Das, N., Levine, R. L., Orr, W. C., et Sohal, R. S. 2001. "Selectivity of protein oxidative damage during aging in *Drosophila melanogaster*". *Biochemical Journal*, vol. 360, p. 209-216.

- Das, J. 2006. "The role of mitochondrial respiration in physiological and evolutionary adaptation". *BioEssays*, vol. 28, p. 890-901.
- David, J. R. 1988. "Temperature". In *Drosophila as a Model Organism for Ageing Studies*, sous la dir. de F. H. Lints et M. H. Soliman, p. 33-45. London: Blackie.
- Dean, M. D., Ballard, K. J., Glass, A. et Ballard, J. W. O. 2003. "Influence of two *Wolbachia* strains on population structure of east African *Drosophila simulans*". *Genetics*, vol. 65, p. 1959-1969.
- Dermitzakis, E. T., Masly, J. P., Waldrip, H. M. et Clark, A. G. 2000. "Non-Mendelian segregation of sex chromosomes in heterospecific *Drosophila* males". *Genetics*, vol. 154, p. 687-694.
- Dowling, D. K., Abiega, K. C. et Arnqvist, G. 2007. "Temperature-specific outcomes of cytoplasmic-nuclear interactions on egg-to-adult development time in seed beetles". *Evolution*, vol. 61, p. 194-201.
- Dzeja, P. P., Bortolon, R., Perez-Terzic, C., Holmuhamedov, E. L. et Terzic, A. 2002. "Energetic communication between mitochondria and nucleus directed by catalyzed phosphotransfer". *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, vol. 99, p. 10156-10161.
- Edmans, S. et Burton, R. S. 1998. "Variation in cytochrome-c oxidase activity is not maternally inherited in the copepod *Tigriopus californicus*". *Heredity*, vol. 80, p. 668-674.
- Ellison, C. K. et Burton, R. S. 2006. "Disruption of mitochondrial function in interpopulation hybrids of *Tigriopus californicus*". *Evolution*, vol. 60, p. 1382-1391.
- Ellison, C. K. et Burton, R. S. 2007. "Interpopulation hybrid breakdown maps to the mitochondrial genome". *Evolution*, vol. 62, p. 631-638.

- Ellison, C. K. et Burton, R. S. 2008. "Genotype-dependent variation of mitochondrial transcriptional profiles in interpopulation hybrids". *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, vol. 105, p. 15831-15836.
- Fangue, N. A., Richards, J. G. et Schulte, P. M. 2009. "Do mitochondrial properties explain intraspecific variation in thermal tolerance?" *Journal of Experimental Biology*, vol. 212, p. 514-522.
- Farge, G., Touraille, S., Debise, R., et Alziari, S. 2003. "The respiratory chain complex thresholds in mitochondria of a *Drosophila subobscura* mutant strain". *Biochimie*, vol. 84, p. 1189-1197.
- Fell, D. A. 1992. "Metabolic control analysis: a survey of its theoretical and experimental development". *Biochemical Journal*, vol. 286, p. 313-330.
- Fell, D. 1997. *Understanding the control of metabolism*. London and Miami: Portland Press.
- Ferguson, M., Mockett, R. J., Shen, Y., Orr, W. C. et Sohal, R. S. 2005. "Age-associated decline in mitochondrial respiration and electron transport in *Drosophila melanogaster*". *Biochemical Journal*, vol. 390, p. 501-511.
- Fontanillas, P., Depraz, A., Giorgi, M. S. et Perrin, N. 2005. "Nonshivering thermogenesis capacity associated to mitochondrial DNA haplotypes and gender in the greater white-toothed shrew, *Crocidura russula*". *Molecular Ecology*, vol. 14, p. 661-670.
- Forman, J.H., et Boveris, A. 1982. "Superoxide radical and hydrogen peroxide in mitochondria". In *Free Radicals in Biology*, sous la dir. de W. A. Pryor, p. 65-90. New York: Academic Press.
- Gardner, P. R. 2002. "Aconitase: sensitive target and measure of superoxide". *Methods in Enzymology*, vol. 349, p. 9-23.

- Gnaiger, E., Lassnig, B., Kuznetsov, A., Reiger, G. et Margreiter, R. 1998. "Mitochondrial oxygen affinity, respiratory flux control and excess capacity of cytochrome *c* oxidase". *Journal of Experimental Biology*, vol. 201, p. 1129-1139.
- Gnaiger, E. et Kuznetsov, A. V. 2002. "Mitochondrial respiration at low levels of oxygen and cytochrome *c*". *Biochemical Society Transactions*, vol. 30, p. 252-258.
- Gnaiger, E., Wright-Paradis, C., Sondergaard, H., Lundby, C., Calbet, J-A., Saltin, B., et al. 2005. "High-resolution respirometry in small biopsies of human muscle: correlations with body mass index and age". *Mitochondrial Physiology Network*, vol. 10, p. 14-15.
- Gnaiger, E. (dir. publ.) 2007. *Mitochondrial pathways and respiratory control*. Innsbruck: OROBOROS® MiPnet Publications.
- Gnaiger, E. 2009. "Capacity of oxidative phosphorylation in human skeletal muscle: New perspectives of mitochondrial physiology". *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, vol. 41, p. 1837-1845.
- Guderley, H., St. Pierre, J., Couture, P., et Hulbert, A. J. 1997. "Plasticity of the properties of mitochondria from rainbow trout red muscle with seasonal acclimatization". *Fish Physiology and Biochemistry*, vol. 16, p. 531-541.
- Guderley, H. 2004. "Metabolic responses to low temperature in fish". *Biological Reviews*, vol. 79, p. 409-427.
- Hardewig, I., Peck, L. S. et Pörtner, H. O. 1999. "Thermal sensitivity of mitochondrial function in the Antarctic Notothenioid *Lepidonotothen nudifrons*". *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 169, p. 597-604.
- Harman, D. 1956. "Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry". *Journal of Gerontology*, vol. 11, p. 298-300.

- Hébert Chatelain, E., Pichaud, N., Ballard, J. W. O., Tanguay, R. M., Morrow, G. et Blier, P. U. 2010. "Functional conservatism among *Drosophila simulans* flies experiencing different thermal regimes and mitochondrial DNA introgression". *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, vol. 314.
- Hochachka, P. W., et Somero, G. N. 1984. *Biochemical adaptation*. Princeton: Princeton University Press.
- Hochachka, P. W. et Somero, G. N. 2002. *Biochemical adaptation: mechanism and process in physiological evolution*. New York: Oxford University Press.
- James, A. C. et Ballard, J. W. O. 2000. "Expression of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans* and its impact on infection frequencies and distribution of *Wolbachia pipientis*". *Evolution*, vol. 54, p. 1661–1672.
- James, A. C. et Ballard, J. W. 2003. "Mitochondrial genotype affects fitness in *Drosophila simulans*". *Genetics*, vol. 164, p.187-194.
- Johnston, I. A., Guderley, H., Franklin, C. E., Crockford, T., et Kamunde, C. 1994. "Are mitochondria subject to evolutionary temperature adaptation?" *Journal of Experimental Biology*, vol. 195, p. 293-306.
- Katewa, S. D. et Ballard, J. W. O. 2007. "Sympatric *Drosophila simulans* flies with distinct mtDNA show difference in mitochondrial respiration and electron transport". *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 37, p. 213–222.
- Keller, M., Sommer, A. M., Pörtner, H. O., et Abele, D. 2004. "Seasonality of energetic functioning and production of reactive oxygen species by lugworm (*Arenicola marina*) mitochondria exposed to acute temperature changes". *Journal of Experimental Biology*, vol. 207, p. 2529-2538.

- Kliman, R. M., Andolfatto, P., Coyne, J. A., Depaulis, F., Kreitman, M., Berry, A. J., McCarter, J., Wakeley, J., et Hey, J. 2000. "The population genetics of the origin and divergence of the *Drosophila simulans* complex species". *Genetics*, vol. 156, p. 1913-1931.
- Kudin, A. P., Bimpong-Buta, N. Y., Vielhaber, S., Elger, C. E. et Kunz, W. S. 2004. "Characterization of superoxide-producing sites in isolated brain mitochondria". *Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, p. 4127-4135.
- Kunz, W. S., Kudin, A., Vielhaber, S., Elger, C. E., Attardi, G. et Villani, G. 2000. "Flux control of cytochrome c oxidase in human skeletal muscle". *Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, p. 27741-27745.
- Kuznetsov, A. V., Clark, J. F., Winkler, K. et Kunz, W. S. 1996. "Increase of flux control of cytochrome c oxidase in copper-deficient mottled brindled mice". *Journal of Biological Chemistry*, vol. 271, p. 283-288.
- Kuznetsov, A. V., Veksler, V., Gellerich, F. N., Saks, V., Margreiter, R. et Kunz, W. S. 2008. "Analysis of mitochondrial function *in situ* in permeabilized muscle fibers, tissues and cells". *Nature Protocols*, vol. 3, p. 965-976.
- Lachaise, D., David, J. R., Lemeunier, F., Tsacas, L., et Ashburner, M. 1986. "The reproductive relationships of *Drosophila sechellia* with *D. mauritiana*, *D. simulans*, and *D. melanogaster* from the Afrotropical region". *Evolution*, vol. 40, p. 262-271.
- Lambert, A. J., et Brand, M. D. 2007. "Research on mitochondria and aging, 2006-2007". *Aging Cell*, vol. 6, p. 417-420.
- Lemeunier, F., et Ashburner, M. 1984. "Relationships within the *melanogaster* species subgroup of the genus *Drosophila* (*Sophophora*)". *Chromosoma*, vol. 89, p. 343-351.

- Lemieux, H., Garedew, A., Blier, P. U., Tardif, J-C. et Gnaiger, E. 2006. "Temperature effects on the control and capacity of mitochondrial respiration in permeabilized fibers of the mouse heart". *Biochimica and Biophysica Acta*, vol. 14, p. 201-202.
- Lemieux, H., Tardif, J-C. et Blier, P. U. 2010. "Thermal sensitivity of oxidative phosphorylation in rat heart mitochondria : does pyruvate dehydrogenase dictate the response to temperature?" *Journal of Thermal Biology*, vol. 35, p. 105-111.
- Lemieux, H., Tardif, J-C., Dutil, J-D. et Blier, P. U. 2010. "Thermal sensitivity of cardiac mitochondrial metabolism in an ectothermic species from a cold environment, Atlantic wolffish (*Anarhichas lupus*)". *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, vol. 384, p. 113-118.
- Letellier, T., Malgat, M., Coquet, M., Moretto, B., Parrot-Roulaud, F. et Mazat, J-P. 1992. "Mitochondrial myopathy studies on permeabilized muscle fibers". *Pediatric Research*, vol. 32, p. 17-22.
- Letellier, T., Heinrich, R., Malgat, M. et Mazat, J-P. 1994. "The kinetic basis of threshold effects observed in mitochondrial diseases: a systemic approach". *Biochemical Journal*, vol. 302, p. 171-174.
- Long, J., Wang,X., Gao, H., Liu,Z., Liu,C., Miao, M., et Liu, J. 2006. "Malonaldehyde acts as a mitochondrial toxin: Inhibitory effects on respiratory function and enzyme activities in isolated rat liver mitochondria". *Life Sciences*, vol. 79, p. 1466-1472.
- Melvin, R.G., Katewa, S. D. et Ballard, J. W. O. 2008. "A candidate complex approach to study functional mitochondrial DNA changes: sequence variation and quaternary structure modeling of *Drosophila simulans* cytochrome c oxidase". *Journal of Molecular Evolution*, vol. 66, p. 232-242.

- Merritt, T. J. S., Sezgin, E., Zhu, C-T. et Eanes, W. F. 2006. "Triglyceride pools, flight and activity variation at the Gpdh locus in *Drosophila melanogaster*". *Genetics*, vol. 172, p. 293-304.
- Milner, D. J., Mavroidis, M., Weisleder, N. et Capetanaki, Y. 2000. "Desmin cytoskeleton linked to muscle mitochondrial distribution and respiratory function". *Journal of Cell Biology*, vol. 150, p. 1283-1298.
- Miwa, S., St-Pierre, J., Partridge, L. et Brand, M. D. 2003. "Superoxide and hydrogen peroxide production by *Drosophila* mitochondria". *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 35, p. 938-948.
- Miwa, S. et Brand, M. D. 2005. "The topology of superoxide production by complex III and glycerol 3-phosphate dehydrogenase in *Drosophila* mitochondria". *Biochimica and Biophysica Acta*, vol. 1709, p. 214-219.
- Murphy, M. P. 2009. "How mitochondria produce reactive oxygen species". *Biochemical Journal*, vol. 417, p. 1-13.
- Nicholls, D. G., et Ferguson, S. J. 2002. *Bioenergetics 3*. London: Academic Press.
- Nigro, L. 1994. "Nuclear background affects frequency dynamics of mitochondrial DNA variants in *Drosophila simulans*". *Heredity*, vol. 72, p. 582-586.
- Orr, W. C., et Sohal, R. 1992. "The effects of catalase gene overexpression on life-span and resistance to oxidative stress in transgenic *Drosophila melanogaster*". *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 297, p. 35-41.
- Pichaud, N., Hébert Chatelain, E., Ballard, J. W. O., Tanguay, R., Morrow, G. et Blier, P. U. 2010. "Thermal sensitivity of mitochondrial metabolism in two distinct mitotypes of *Drosophila simulans*: evaluation of mitochondrial plasticity". *Journal of Experimental Biology*, vol. 213, p. 1665-1675.

- Pichaud, N., Ballard, J. W. O., Tanguay, R. M. et Blier, P. U. 2011. "Thermal sensitivity of mitochondrial functions in permeabilized muscle fibers from two populations of *Drosophila simulans* with divergent mitotypes". *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, in press.
- Pörtner, H. O. 2002. "Physiological basis of temperature-dependent biogeography: trade-offs in muscle design and performance in polar ectotherms". *Journal of Experimental Biology*, vol. 205, p. 2217-2230.
- Rand, D. M., Haney, R. A. et Fry, A. J. 2004. "Cytonuclear coevolution: the genomics of cooperation". *Trends in Ecology and Evolution*, vol. 19, p. 645-653.
- Rasmussen, H. N. et Rasmussen, U. F. 2003. "Oxygen solubilities of media used on electrochemical respiration measurements". *Analytical Biochemistry*, vol. 319, p. 105-113.
- Rawson, P. D. et Burton, R. S. 2002. "Functional coadaptation between cytochrome *c* and cytochrome *c* oxidase within allopatric populations of a marine copepod". *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, vol. 99, p. 12955-12958.
- Rizzuto, R., Pinton, P., Carrington, W., Fay, F. S., Fogarty, K. E., Lifshitz, L. M., Tuft, R. A. et Pozzan, T. 1998. "Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca^{2+} responses". *Science*, vol. 280, p. 1763-1765.
- Rossignol, R., Malgat, M., Mazat, J-P., et Letellier, T. 1999. "Threshold effect and tissue specificity". *Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, p. 33426-33432.
- Rossignol, R., Faustin, B., Rocher, C., Malgat, M., Mazat, J-P. et Letellier, T. 2003. "Mitochondrial threshold effects". *Biochemical Journal*, vol. 370, p. 751-762.

- Sackton, T. B., Haney, R. A. et Rand, D. M. 2003. "Cytonuclear coadaptation in *Drosophila*: disruption of cytochrome *c* oxidase activity in backcross genotypes". *Evolution*, vol. 57, p. 2315-2325.
- Saks, V. A., Veksler, V. I., Kuznetsov, A. V., Kay, L., Sikk, P., Tiivel, T., Tranqui, L., Olvares, J., Winkler, K., Wiedemann, F. et Kunz, W. S. 1998. "Permeabilized cell and skinned fiber techniques in studies of mitochondrial function *in vivo*". *Molecular and Cellular Biochemistry*, vol. 184, p. 81-100.
- Sastre, J., Pallardo, F. V., et Vina, J. 2000. "Mitochondrial oxidative stress plays a key role in aging and apoptosis". *IUBMB Life*, vol. 49, 427-435.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. et Klenk, M. D. 1985. "Measurement of protein using bicinchoninic acid". *Analytical Biochemistry*, vol. 150, p. 76-85.
- Solomons, G., et Fryhle, C. 2000. *Chimie organique*. Montréal : Modulo.
- Somero, G. N. 2004. "Adaptation of enzymes to temperature: searching for basic strategies". *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 139, p. 321-333.
- St-Pierre, J., Buckingham, J. A., Roebuck, S. J., et Brand, M. D. 2002. "Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain". *Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, p. 44784-44790.
- Suarez, R. K., Staples, J. F., Lighton, J. R. B., et West, T. G. 1997. "Relationships between enzymatic flux capacities and metabolic flux rates: nonequilibrium reactions in muscle glycolysis". *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, vol. 94, p. 7065-7069.
- Thibeault, M., Blier, P. U. et Guderley, H. 1997. "Seasonal variation of muscle metabolic organization in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)". *Fish Physiology and Biochemistry*, vol. 16, p. 139-155.

- Tretter, L., Takacs, K., Kövér, K., et Adam-Vizi, V. 2007. "Stimulation of H₂O₂ generation by calcium in brain mitochondria respiring on α -glycerophosphate." *Journal of Neuroscience Research*, vol. 85. P. 3471-3479.
- Tschischka, K., Abele, D., et Pörtner, H. O. 2000. "Mitochondrial oxyconformity and cold adaptation in the polychaete *Nereis pelagica* and the bivalve *Arctica Islandica* from the Baltic and White seas". *Journal of Experimental Biology*, vol. 203, p. 3355-3368.
- Turrens, J. F. 2003. "Mitochondrial formation of reactive oxygen species". *Journal of Physiology*, vol. 55, p. 335-344.
- Ulrich, P. N., et Marsh, A. G. 2009. "Thermal sensitivity of mitochondrial respiration efficiency and protein phosphorylation in the clam *Mercenaria mercenaria*". *Marine Biotechnology*, vol. 11, p. 608-618.
- Van Den Bergh, S. G. et Slater, E. C. 1962. "The respiratory activity and permeability of housefly sarcosomes". *Biochemical Journal*, vol. 82, p. 362-371.
- Veksler, V. I., Kuznetsov, A. V., Sharov, V. G., Kapelko, V. I. et Saks, V. A. 1987. "Mitochondrial respiratory parameters in cardiac tissue: a novel method of assessment by using saponin-skinned fibers". *Biochimica and Biophysica Acta*, vol. 892, p. 191-196.
- Villani, G. et Attardi, G. 1997. "In vivo control of respiration by cytochrome c oxidase in wild-type and mitochondrial DNA mutation-carrying human cells". *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, vol. 94, p. 1166-1171.
- Villani, G., Greco, M., Papa, S. et Attardi, G. 1998. "Low reserve of cytochrome c oxidase capacity *in vivo* in the respiratory chain of a variety of human cell types". *Journal of Biological Chemistry*, vol. 273, p. 31829-31836.

- Walker, D. W., Hájek, P., Muffat, J., Knoepfle, D., Cornelison, S., Attardi, G. et Benzer, S. 2006. "Hypersensitivity to oxygen and shortened lifespan in a *Drosophila* mitochondrial complex II mutant". *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, vol. 103, p. 16382-16387.
- Wallace, D. C. 1986. "Mitotic segregation of mitochondrial DNAs in human cell hybrids and expression of chloramphenicol resistance". *Somatic Cell and Molecular Genetics*, vol. 12, p. 41-49.
- Wallace, D. C. 2007. "Why do we still have maternally inherited mitochondrial DNA? Insights from evolutionary medicine". *Annual Review of Biochemistry*, vol. 76, p. 781-821.
- Watada, M., Ohba, S., et Tobari, Y. N. 1986. "Genetic differentiation in Japanese populations of *Drosophila simulans* and *Drosophila melanogaster*. II. Morphological variation". *Japanese Journal of Genetics*, vol. 61, p. 469-480.
- Wei, Y-H., Lu, C-Y., Lee, H-C., Pang, C-Y., et Ma, Y-S. 1998. "Mitochondrial DNA and Age-dependent Decline of Mitochondrial Respiratory Function". *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 854, p. 155-170.
- Willett, C. S. et Burton, R. S. 2001. "Viability of cytochrome c genotypes depends on cytoplasmic backgrounds in *Tigriopus californicus*". *Evolution*, vol. 55, 1592-1599.
- Willett, C. S. et Burton, R. S. 2004. "Evolution of interacting proteins in the mitochondrial electron transport system in a marine copepod". *Molecular Biology and Evolution*, vol. 21, p. 443-453.
- Yan, L.J., and Sohal, R.S. (1998). "Mitochondrial adenine nucleotide translocase is oxidatively modified during aging". *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, vol. 95, p. 12896-12901.

- Yan, L-J., R. Levine and Sohal, R. S. (1997). "Oxidative damage during aging targets mitochondrial aconitase". *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, vol. 94, p. 11168-11172.
- Yarian, C. S., and Sohal, R. S. (2005). "In the aging housefly aconitase is the only citric acid cycle enzyme to decline significantly". *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, vol. 37, p. 91-96.